

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE PÂNICO SITUACIONAL

MARINALDO BARBOSA PRADO

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Julho de 2018

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE PÂNICO SITUACIONAL

MARINALDO BARBOSA PRADO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____ de _____ 2018

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

(Orientador, Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES)

Profa. Dra. Livia Carla de Melo Rodrigues

(Presidente da banca, Departamento de Ciências Fisiológicas, UFES)

Profa. Dra. Vanessa Beijamini

(Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFES)

Prof. Dr. Hélio Zangrossi Jr

(Departamento de Farmacologia, FMRP-USP)

Profa. Dra. Sônia Alves Gouvêa

(Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFES)

Prado, Marinaldo Barbosa.

Desenvolvimento de um Modelo Experimental de Pânico Situacional [Vitória]
2018. 91p., 29,7 cm (UFES, Msc. Ciências Fisiológicas, 2018).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Estimulação Elétrica Intracraniana, 2. Matéria Cinzenta Periaquedutal,
3. Pânico Situacional, 4. Agorafobia, 5. Estresse

AGRADECIMENTOS

A princípio todos os experimentos e pesquisa que temos que desenvolver em dois anos parecem ser fáceis, mas tão logo nos deparamos com muitos obstáculos e necessidades de alguém para nos ajudar, por isso aqui está meus agradecimentos a cada uma das pessoas que de alguma forma foram precisas nessa minha caminhada até aqui.

Ao Grande Mestre, Sabedor de todas as coisas, **YHWH**.

Agradeço ao meu orientador senhor Doutor **Luiz Carlos Schenberg** por ter pensado em toda metodologia da análise comportamental dos animais, tão como a orientação no sentido de obter os objetivos esperados, bem como com a análise estatística dos dados. Meus sinceros agradecimentos a Mestra **Ana Cristina Borges Aguiar** e a Doutora **Cláudia Janaina Torres Müller**, que foram as duas pessoas responsáveis por me ensinar quase todas as práticas relativas ao laboratório apesar de já não serem alunas – sem a ajuda de vocês duas eu nem teria começado. Meu muito obrigado também à professora Doutora **Jeyce Willig Quintino dos Santos**, sobretudo pelas explicações sobre anestesia, marcação das lâminas histológicas e outras dicas: Muitíssimo obrigado!

Meus sinceros agradecimentos as professoras Doutoradas **Lívia Carla de Melo Rodrigues** e **Vanessa Beijamini Harres** que trabalharam na análise da minha dissertação sempre visando um melhor resultado do trabalho e também foram responsáveis pela minha qualificação. Em conformidade também para uma melhor criticidade do trabalho, eu agradeço ao Doutor professor **Hélio Zangrossi Júnior**, que também contribuiu significativamente para a realização da análise deste trabalho. Muitíssimo obrigado pelas Avaliações e contribuições!

Eu agradeço as Mestradas **Lara Miranda Damasceno** e **Glenda Gomes Ferreira**, bem como os colegas de Iniciação Científica (IC), **Ranna Batista Wanzeler**, **Fabíola Donato Rosa Chioato** e **Hugo Sanches Moreira De Rezende**, que em alguns momentos puderam me auxiliar, mas mais do que isso, eu agradeço pelo bom convívio que tive com vocês. Ainda do nosso laboratório, mesmo não tendo muito tempo juntos, cito aqui o bom convívio com a colega **Caroline Azevedo Rosa** (Doutoranda) e os colegas **Rafael Carvalho Lages** e **Vinícius Menegardo Nunes** (Mestrandos) – Meu muito obrigado a todos vocês do **LANTHA**.

Outro professor que sempre tirou algumas dúvidas ou até sugeriu algumas práticas foi o professor Doutor **Alexandre Martins Costa Santos**, a quem devo pedir antes é desculpas, pois eu sempre estava no laboratório dele querendo tirar alguma dúvida; não houve nenhum momento em que ele disse que estava ocupado ou não tinha tempo; sempre me atendeu de bom grado – Meu muito obrigado!

Quero agradecer aqui a equipe do Biotério: ao Médico Veterinário **Rodolpho José da Silva Barros** e aos senhores **Amarildo** e **José Amaral** (Serra dos Aimorés); vocês formam uma equipe muito responsável e eficiente – Meu muito obrigado pela a agilidade de vocês e também pelo bom atendimento!

Agradeço a **Danielle Lessa Junger** e **Mário Armando Dantas**, que sempre estiveram dispostos para preparar o LHTM (Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica), e ora ou outra até me ajudava em alguma dificuldade. – Muito obrigado!

À professora Doutora **Nazaré Souza Bissoli** expresso minha gratidão por ter nos permitido utilizar o seu espaço no freezer (-80); professora sempre muito gentil bem como a **Antonio de Melo Ferreira Junior**, **Glauciene Januário de Sousa** e todos os **Pesquisadores** do Laboratório de Hipertensão Experimental. Também meus sinceros agradecimentos ao Doutorando **Fabício Bragança da Silva**, que desde o início facilitou a utilização do Laboratório Multiusuário e tirou algumas dúvidas sobre o funcionamento do curso.

Meus agradecimentos para as professoras Doutoras **Rita Gomes Wanderley Pires** e **Cristina Martins e Silva** (Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental) por nos ter emprestado seu espaço e produtos para o desenvolvimento de parte do nosso experimento. Agradeço a colega e doutoranda **Tamara Andrea Alarcon Ferreira** por ter me auxiliado no momento que estive em seu laboratório e também a todos os demais colegas como **Rafael Moraes Aguiar**, **Glenda Ferreira**, **Sarah da Silva** e aos IC's **Natilie** e **Mateus**, os quais me receberam muito bem – Muito obrigado a todos vocês!

Agradeço ao Técnico Mestre **Evaldo Vitor Pereira**, que pacientemente sempre me atendeu e também me deu algumas dicas sobre os experimentos; também agradeço ao Técnico Mestre **Anderson** e sua esposa **Cíntia Silva Lirio** (secretária), que conforme cada um na sua função, sempre me atenderam com muita gentileza e sempre dispostos a ajudar. Não posso deixar de agradecer também ao ex-secretário **Fonseca**, que mesmo quando eu estava distante, ele

respondia meus e-mails e tirou minhas dúvidas sobre o Programa do Mestrado. Outras duas pessoas que eu agradeço aqui são as Mestras técnicas **Natércia Carvalho Alves** e **Caroline Ohnesorge Maia**, responsáveis pelos trabalhos do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM); meus sinceros agradecimentos a vocês e me desculpe por estar aí toda hora “enchendo as suas paciências” – Muito Obrigado!

Agradeço a **todos os colegas que fizeram as matérias comigo** e que de uma forma ou de outra me ajudaram, tirando algumas dúvidas ou enviando algum artigo útil. Meu muito obrigado a todos vocês! Agradeço ao **João Batista** e ao **Diego**, responsáveis pela manutenção da retirada dos Resíduos biológicos; vocês, talvez, não fazem ideia o quanto os seus trabalhos são muito importante para nós; agradeço também a **todas as mulheres da limpeza** e demais funcionários, tais como a **equipe do Restaurante Universitário** e aos **guardas** (Seguranças), que trabalham nessa Instituição para que as “coisas” possam acontecer.

E é claro, não poderia deixar de agradecer especialmente cada um dos **meus Parentes (Mãe, Irmãos e outros)** que muito torceram por mim e me deram palavras de ânimo quando a “barra estava pesada”. Afinal, sem os conselhos de alguns vocês, talvez eu não tivesse forças para continuar. – **Muitíssimo obrigado!**

Agradeço aos **Ratos** (*In memoriam*) que serviram como o principal instrumento para a nossa pesquisa (mas são apenas ratos?); natureza essa que erroneamente julgamos sem lógica. Apesar de serem para nós apenas estatística, as suas naturezas comportamentais nos permitiu analisar e fazer algumas comparações com os comportamentos humanos.

SUMÁRIO

1	PROCESSOS COGNITIVOS E NÃO COGNITIVOS DO TRANSTORNO DO PÂNICO	15
1.1	<i>Pânico espontâneo, pânico situacional e agorafobia</i>	15
2	BASES NEURAIS DO MEDO CONDICIONADO A ESTÍMULOS E CONTEXTOS AVERSIVOS	24
2.1	<i>Funções cognitivas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal</i>	30
2.2	<i>Papel da matéria cinzenta periaquedutal nos ataques de pânico</i>	35
3	DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE PÂNICO SITUACIONAL	39
3.1	PAPEL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NO MEDO CONDICIONADO	39
3.2	OBJETIVO	45
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3.4	MÉTODOS	46
3.4.1	<i>Animais</i>	46
3.4.2	<i>Eletrodos intracranianos</i>	46
3.4.3	<i>Eletrodos subcutâneos</i>	46
3.4.4	<i>Implantação de eletrodos intracranianos</i>	46
3.4.5	<i>Implantação de eletrodos subcutâneos</i>	47
3.4.6	<i>Caixa de Estimulação</i>	48
3.4.8	<i>Determinação do limiar de contorção ao choque subcutâneo</i>	48
3.4.9	<i>Estresse de restrição</i>	49
3.4.10	<i>Tratamento com corticosterona (CORT)</i>	49

3.4.11	<i>Registros comportamentais</i>	49
3.4.12	<i>Histologia</i>	52
3.4.13	<i>Descarte das carcaças</i>	53
3.4.14	<i>Protocolos Experimentais</i>	53
3.4.15	<i>Análise Estatística</i>	56
4	RESULTADOS	57
4.1	<i>4.1 Comportamento dos ratos na primeira exposição/re-exposição ao contexto no qual foi realizada a determinação dos limiares de fuga ou contorção.</i>	58
4.2	<i>Comportamento total dos ratos em 5 pareamentos do contexto à estimulação da MCPD ou aos choques subcutâneos</i>	59
4.3	<i>Curso temporal das respostas do rato ao longo de 5 pareamentos do contexto à estimulação da MCPD ou ao choque subcutâneo</i>	61
4.4	<i>Localização dos sítios estimulados</i>	66
5.	DISCUSSÃO	67
5.1	<i>Ao invés do congelamento, ratos expostos ao contexto da estimulação elétrica da MCPD apresentam hiperatividade.</i>	67
5.2	<i>Efeitos tempo-dependentes do estresse sobre a hiperatividade ao contexto da estimulação da MCPD.</i>	71
6.	Conclusões	72
	REFERÊNCIAS	74

TABELAS

Tabela 1:	Porcentagem dos sintomas (\pm EPM) de ataques de pânico descritos pelos pacientes como pânicos espontâneos ou situacionais	20
Tabela 2:	Protocolo experimental. Ratos implantados com eletrodos intracranianos ou subcutâneos foram expostos por 10 min à caixa de estimulação (CE) ao longo de 5 dias consecutivos (D36-D40)	56
Tabela 3.	Intensidades médias (\pm EPM) da estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (30 s, 60 Hz, a.c.)	57

FIGURAS

Figura 1:	Frequência semestral de atendimento de pacientes com transtornos de ansiedade na Universidade de Goettingen	18
Figura 2:	Resposta do cortisol no teste CRH/dexametasona em controles, pacientes com pânico simples e pacientes com depressão maior	34
Figura 3:	Organização colunar da matéria cinzenta periaquedutal	37
Figura 4:	Respostas comportamentais na primeira exposição de ratos virgens à arena de estimulação ou na primeira re-exposição de ratos experientes 6 dias após as sessões de triagem com estimulação da MCPD ou choque subcutâneo	60
Figura 5:	Respostas comportamentais totais de 5 exposições ao contexto seguidas de estimulação da MCPD ou choque subcutâneo	61
Figura 6:	Curso temporal das respostas de imobilidade (acima) e locomoção (abaixo) ao longo de 5 pareamentos do contexto à estimulação da MCPD ou ao choque subcutâneo	63
Figura 7:	Curso temporal das respostas de levantar (acima) e autolimpeza (abaixo) ao longo de 5 pareamentos do contexto do contexto à estimulação da MCPD ou ao choque subcutâneo	64
Figura 8:	Curso temporal das respostas de avaliação de risco (acima) e defecação (abaixo) ao longo de 5 pareamentos do contexto à estimulação da MCPD ou ao choque subcutâneo	65
Figura 9:	Sítios estimulados	66

ABREVIATURAS

ABL	Amígdala basolateral
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AL	Amígdala lateral
AMe	Amígdala medial
ANOVA	Análise de variância
APA	Associação Psiquiátrica Americana
CO ₂	Dióxido de carbono
CORT	Corticosterona
CORT-0	Grupo injetado com CORT imediatamente antes da exposição
CORT-90	Grupo injetado com CORT 90 min antes da exposição
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CS	Colículo superior
CSC	Grupo choque subcutâneo
CTR	Grupo controle
DSM	Manual de diagnóstico e estatística da APA
EIC-1	Grupo limiar e estimulação
EIC-2	Grupo sem limiar, mas estimulado
GR	Receptores glicocorticóides
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HREs	Elementos responsivos a hormônios (<i>hormone responsive elements</i>)
i.p.	Intraperitoneal
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal

MCPD	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPAdl	Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPAdm	Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial
MCPAl	Matéria cinzenta periaquedutal lateral
MCPAvl	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
MR	Receptores mineralocorticóides
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RTR-0	Estresse de restrição contíguo à exposição
RTR-90	Estresse de restrição 90 min anterior à exposição
TA	Transtorno de ansiedade
TP	Transtorno do pânico

RESUMO: Embora os ataques de pânico sejam similares ao medo, eles não são acompanhados da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O eixo HHA está igualmente inativo no pânico experimental à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPD). Como os glicocorticoides têm funções proeminentes na consolidação da memória, a quiescência/inibição do eixo HHA pode proteger o indivíduo contra o desenvolvimento de pânico situacional e da agorafobia. Portanto, o presente estudo examinou se a estimulação aversiva da MCPD suporta o condicionamento ao contexto da sua aplicação e se as respostas condicionadas são facilitadas pelo estresse de restrição (10 min) ou pela corticosterona (10 mg/kg, I.P.) aplicados 90 min ou imediatamente antes da sessão- teste. Para isto, os ratos foram submetidos a choques subcutâneos ou estimulações da MCPD e expostos ao respectivo contexto 7 dias após. Os pareamentos foram repetidos por 5 dias consecutivos. Surpreendentemente, enquanto os ratos submetidos ao choque apresentaram respostas robustas de congelamento em todas re-exposições, os ratos submetidos à estimulação da MCPD apresentaram um aumento expressivo da atividade (hiperatividade condicionada) que foi progressivamente atenuado ao longo das 5 exposições. Em contraste, não foram observados nem congelamento, nem hiperatividade nas re- exposições ao contexto da estimulação da MCPD em intervalos de 24 h. Notavelmente, enquanto a hiperatividade foi facilitada pelo estresse contíguo à re- exposição, ela foi abolida pelo estresse realizado 90 min antes. A corticosterona teve efeitos similares ao estresse. Estes resultados sugerem que o estresse contingente ao ataque de pânico favoreça o desenvolvimento do pânico situacional e, provavelmente, agorafobia.

Palavras chave: Agorafobia, Ataque de Pânico, Corticosterona, Estresse, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Pânico Situacional.

ABSTRACT: Although panic attacks are similar to fear, they are not accompanied by activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA). The HPA axis remains likewise inactive in experimental panics to electrical stimulations of dorsal periaqueductal gray matter (DPAG). Because glucocorticoids have prominent roles in memory consolidation, the quiescence/inhibition of the HHA axis may protect the individual against the development of situational panic and agoraphobia. Therefore, the present study examined whether the aversive stimulation of MCPD supports the acquisition of conditioned responses to the context and whether these responses are facilitated by restraint stress (10 min) or the corticosterone (10 mg / kg, IP) applied 90 min or immediately before the test session. For this, the rats were subjected to either a subcutaneous shock or a DPAG stimulation and exposed to the respective context 7 days later. Pairings were then repeated for 5 consecutive days. Surprisingly, while shocked rats presented robust freezing responses in all re-exposures, DPAG- stimulated rats showed an expressive increase of activity (conditioned hyperactivity) that was progressively attenuated over 5 exposures. In contrast, neither the freezing nor the hyperactivity was observed during re-exposures to the context of stimulation carried out at 24 h intervals. Remarkably, as well, while hyperactivity was facilitated by a stress contiguous to the re-exposure, it was abolished by the stress performed 90 min before. Corticosterone had effects similar to contingent stress. These results suggest that stress contingent to panic attack favors the development of both situational panic and agoraphobia.

Keywords: Agoraphobia, Panic Attack, Corticosterone, Stress, Periaqueductal Gray Matter, Situational Panic.

1. PROCESSOS COGNITIVOS E NÃO COGNITIVOS DO TRANSTORNO DO PÂNICO

1.1. PÂNICO ESPONTÂNEO, PÂNICO SITUACIONAL E AGORAFOBIA

O medo e a ansiedade são emoções que cumprem papéis fundamentais na sobrevivência do indivíduo e da espécie. Segundo Darwin (1872) o homem amedrontado *“fica primeiro paralisado, sem respiração, ou então se agacha, como para não ser visto ...os músculos superficiais tremem ...Os olhos saltados fixam-se no objeto do terror...Em outros casos, produz-se um súbito e incontrolável impulso de fugir”*. Darwin (1872) também fez uma descrição pormenorizada das respostas viscerais e autonômicas, *“O coração bate rápida e violentamente ... a pele fica instantaneamente pálida ... e exsuda ... [mas] a superfície permanece fria, de onde a expressão ‘suar frio’ ... Os pelos sobre a pele se eriçam, ... a respiração se acelera ... a boca fica seca ... À medida que o medo evolui para o terror ... O coração dispara, ou pode falhar e provocar um desmaio; há uma palidez de morte; a respiração é difícil ... a garganta fecha e engolimos seco ... Os intestinos são afetados. Os músculos do esfíncter deixam de agir e não mais retêm os conteúdos do corpo”*. Contudo, existem circunstâncias em que estas respostas são desproporcionais à ameaça real ou ocorrem até mesmo na ausência de qualquer ameaça identificável. Nestas condições, diz-se que a ansiedade é patológica e prejudicial ao indivíduo.

Embora seja difícil traçar um limite preciso entre ansiedade normal e patológica, o medo e a ansiedade apresentam formas variadas em homens e

animais. Em animais, o medo é geralmente associado às respostas ativas de fuga a uma ameaça próxima ou iminente, enquanto a ansiedade é associada às respostas de inibição comportamental, cautela (avaliação de risco) e esquiva às ameaças distantes ou potenciais (Deakin e Graeff, 1991; Gray e McNaughton, 2000). As respostas de defesa também dependem do contexto da ameaça. Por exemplo, a apresentação de um gato (ameaça proximal) a um rato elicia tanto a fuga para o abrigo mais próximo quanto a agressão defensiva (“raiva”) se o rato for encurralado, ou o “comportamento de congelamento” (*freezing behavior*), que pode durar várias horas, nos ratos que encontraram abrigo ou permaneceram em suas tocas (Blanchard e Blanchard, 1989). Embora possamos encontrar comportamentos análogos no ser humano (Blanchard *et al.*, 2001), a descrição clínica dos transtornos de ansiedade (TA) confere mais ênfase aos aspectos subjetivos (preocupação, sentir-se inseguro, dificuldade de concentração, irritabilidade, etc.) e às respostas viscerais e autonômicas (palpitações, sudorese, boca seca, dificuldade de respirar, etc.) (APA, 2013).

Em todo caso, os TAs consistem no medo e ansiedade excessivos e em comportamentos aberrantes associados a estratégias defensivas contra ameaças reais ou imaginárias, presentes ou futuras. No caso das ameaças reais, o medo e a ansiedade devem ser desproporcionais às ameaças e persistir por mais de seis meses (APA, 2013). Em suma, a ansiedade é considerada patológica quando causa prejuízos à qualidade de vida e conforto do indivíduo, impedindo a realização dos seus objetivos (Hales e Yudofsky, 1987).

Os alicerces da classificação dos TAs foram lançados há mais de um

século por Sigmund Freud (1895). Mais notavelmente, Freud identificou dois transtornos fundamentais: uma síndrome predominante, que ele denominou “expectativa ansiosa”, e outra menos comum, denominada “ataques de ansiedade”. Segundo Freud, enquanto a ansiedade da “expectativa ansiosa” é flutuante e controla as ideias de forma antecipada aos acontecimentos, gerando preocupação, pessimismo e distorção da realidade, nos “ataques de ansiedade” a ansiedade irrompe abruptamente na consciência sem ter sido associada a nenhuma ideia. Freud também observou que os ataques de ansiedade eram frequentemente acompanhados de “agorafobia” (medo de locais públicos) e que esta não era relacionada a nenhuma ideia ou contexto, mas à presença de vertigem durante o ataque de ansiedade. Seus estudos também conferiram importância fundamental às “neuroses obsessivas”, pois considerava que as obsessões e compulsões seriam pistas de traumas excluídos da esfera consciente. Atualmente, estas síndromes correspondem ao transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do pânico (TP) e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), respectivamente. A classificação atual também inclui as fobias específicas, fobia social, agorafobia, transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) e transtorno agudo de estresse, dentre as mais importantes (APA, 2013).

Dentre as manifestações clínicas da ansiedade, os ataques de pânico (AP) são o elemento central do TP. Os AP são crises recorrentes e inesperadas de medo e desconforto intensos que alcançam intensidade máxima em aproximadamente 10 minutos e duram entre 1 a 4 h em 50% dos pacientes (Angst e Wicki, 1993). O diagnóstico do TP requer que os AP sejam seguidos por pelo menos um mês de sequelas comportamentais, incluindo o

receio de ter novos ataques ou preocupações sobre possíveis implicações destes ataques (por ex., perder o controle, ter uma parada cardíaca, enlouquecer). Embora os AP possam ser deflagrados por contextos similares aos dos ataques anteriores (pânico situacional), o diagnóstico de TP exclui os AP que somente ocorrem durante a exposição a estímulos específicos (por ex., fobia social, fobia específica, TOC, TEPT, etc) (APA, 2000, 2013).

Embora a prevalência do TP seja de 2% a 3% (APA, 2013), ele é 2 vezes mais frequente em mulheres e pode ocorrer em até 10% dos jovens adultos (4,8% em homens e 14,9% em mulheres) (Angst e Wicki, 1993; Briggs et al., 1993; Stirton and Brandon, 1988). Não obstante, O TP é a emergência mais frequente em clínicas de ansiedade (Bandelow e Michaelis, 2015) (Fig.1).

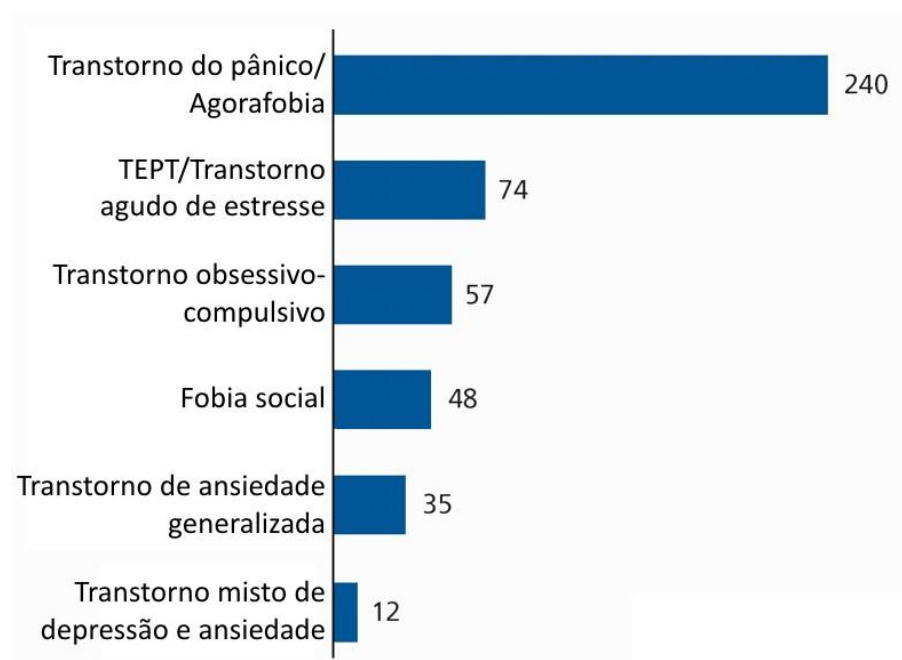


Figura 1. Frequência semestral de atendimento de pacientes com transtornos de ansiedade na Universidade de Goettingen (de Bandelow & Michaelis, 2015).

Pacientes com TP também se queixam de “ansiedade antecipatória”, isto é, do medo de falta de amparo na eventualidade de um AP, uma condição que pode agravar-se em “agorafobia” incapacitante. Não surpreendentemente, a agorafobia tem prevalência de 2,6% na população, de 7,4% nos pacientes com TP simples e, notavelmente, de 28,6% no TP complicado por depressão maior (DM) (Angst e Wicki, 1993). A prevalência de agorafobia em pacientes com diagnóstico simples de DM (2,8%) é, no entanto, similar à da população. Estes dados sugerem que a ocorrência de AP seja um elemento fundamental para o desenvolvimento da agorafobia. Não surpreendentemente, os critérios de diagnóstico de agorafobia são fortemente baseados no registro de APs antecedentes e/ou no receio de novos APs (ansiedade antecipatória) (APA, 2000). A agorafobia tem um custo social elevado. A cada ano, 1,7% dos adolescentes e jovens adultos são diagnosticados como agorafóbicos e mais de um terço dos indivíduos afetados vive restrito à sua casa, interrompendo estudo e atividades profissionais.

Embora o DSM-V descreva a agorafobia como o medo ou ansiedade intensos à exposição real ou potencial a locais abertos e/ou fechados, a transportes públicos, a filas ou multidões, ou aos locais ermos e desolados (APA, 2013), a “agorafobia” também pode ser independente do contexto, desenvolvendo-se após um único AP. Isto pode ser devido ao fato de que “o medo da falta de amparo durante o AP” acompanha o paciente aonde quer que este vá. Como consequência, o paciente opta por uma vida enclausurada em sua residência, ou na residência de algum parente, onde se sinta seguro. Contudo, é importante notar que apenas 14,3% dos pacientes apresentam agorafobia (Angst e Wicki, 1993) e que muitos agorafóbicos não tem problema

algun em sair de casa desde que acompanhados por alguém de confiança. Portanto, não podemos equiparar a agorafobia do TP à “fobia de locais públicos” simplesmente. A agorafobia também é muito mais frequente no pânico complicado por depressão. Em particular, Angst e Wicki (1993) observaram que enquanto a frequência de agorafobia seja de apenas 2,6% e 2,8% em controles e pacientes depressivos, ela atinge 7,4% e 28,6% nos pacientes com pânico simples e pânico complicado por depressão, respectivamente. Os AP também parecem ser independentes da ansiedade antecipatória uma vez que a última pode subsistir à remissão completa dos AP em pacientes tratados com imipramina (Klein, 1964).

Tabela 1. Porcentagem dos sintomas (\pm EPM) de ataques de pânico descritos pelos pacientes como pânicos espontâneos ou situacionais. Os sintomas originais foram reclassificados segundo ordem decrescente dos ataques espontâneos. *n*, número de pacientes (modificado de Krystal *et al.*, 1991).

Sintomas do Pânico (DSM-III-R)	Ataques Espontâneos (<i>n</i> =46)	Ataques Situacionais (<i>n</i> =47)	Ataques Totais (<i>n</i> =57)
Vertigem, desmaio	61,9 \pm 5,7	64,7 \pm 5,4	63,0 \pm 4,5
Palpitação	58,2 \pm 6,1	58,7 \pm 6,3	60,5 \pm 5,4
Tremores, vibrações	46,9 \pm 6,0	41,7 \pm 5,4	44,1 \pm 4,8
Falta de ar (<i>shortness of breath</i>)	45,7 \pm 6,2	45,2 \pm 5,7	44,5 \pm 4,8
Medo de perder controle e/ou razão	44,7 \pm 5,8	54,5 \pm 5,6	48,5 \pm 4,9
Sensação de irrealidade	40,7 \pm 5,9	31,5 \pm 5,6	31,6 \pm 4,7
Sudorese	37,2 \pm 5,8	45,2 \pm 6,0	41,6 \pm 5,0
Aperto no peito (<i>chest tightness</i>)	32,0 \pm 5,8	39,8 \pm 6,0	38,2 \pm 4,8
Ondas de calor ou frio	28,6 \pm 5,0	34,2 \pm 5,6	31,5 \pm 4,4
Medo de morrer	24,4 \pm 5,5	14,5 \pm 4,0	19,7 \pm 4,1
Náusea	20,5 \pm 4,5	17,7 \pm 4,0	20,2 \pm 3,5
Sensação de sufocamento	19,8 \pm 5,1	19,5 \pm 5,1	16,8 \pm 4,0
Dormência ou formigamento	18,5 \pm 4,3	20,4 \pm 4,1	19,2 \pm 3,3

No mesmo sentido, os AP são resistentes a terapias cognitivas e/ou de relaxamento que produziram atenuações significativas da ansiedade antecipatória (Adler *et al.*, 1989). Adicionalmente, Adler e colaboradores (1989)

observaram que a ansiedade antecipatória correlaciona-se de forma apenas fraca ou moderada com a agorafobia e a gravidade da condição clínica, respectivamente. A dissociação tanto farmacológica quanto comportamental de pânico e ansiedade antecipatória sugere que estas condições sejam mediadas por processos relativamente independentes.

Não obstante, os AP também são desencadeados por contextos ou estímulos associados àqueles dos ataques anteriores. Em realidade, Krystal e colaboradores (1991) encontraram prevalências similares para ataques espontâneos (82%) e situacionais (81%) (Tabela 1). A prevalência total de 163% indica que 63% dos pacientes apresentaram ambos os tipos de ataques. Nestes pacientes, os ataques espontâneos foram similares aos ataques situacionais quanto à gravidade ($5,4 \pm 1,7$ vs $5,8 \pm 1,5$), duração ($39,9 \pm 34,6$ vs $50,5 \pm 41,9$ min), frequência semanal ($2,2 \pm 1,5$ vs $2,6 \pm 2,9$) e número de sintomas ($5,0 \pm 2,3$ vs $4,8 \pm 2,1$) (Tabela 1).

Embora frequência dos sintomas também tenha sido similar em ambos os tipos de ataque, o “medo de morrer” foi marginalmente mais frequente nos ataques espontâneos. Os ataques espontâneos também foram similares aos AP noturnos (8% dos AP) tanto em relação ao número de sintomas quanto à duração e gravidade. A existência de “ataques situacionais” sugere o desenvolvimento de “pânico condicionado” ao contexto e/ou estímulos associados aos ataques anteriores. Por outro lado, como a agorafobia correlacionou-se apenas fracamente com a ansiedade antecipatória (Adler *et al.*, 1989), o seu desenvolvimento poderia ser devido à combinação dos processos endógenos implicados na ansiedade antecipatória com os processos de condicionamento do pânico aos contextos e/ou estímulos externos. Em

particular, agorafóbicos graves (*extensive avoiders*) apresentam histórico mais prolongado tanto de ansiedade antecipatória quanto de pânico (Adler *et al.*, 1989). Os últimos autores também mostraram que a agorafobia apresenta latência bastante prolongada (117 ± 107 meses em agorafóbicos graves), sugerindo que o seu desenvolvimento seja um processo secundário devido à generalização do pânico situacional a múltiplos contextos. Ficamos, portanto, com duas hipóteses: 1) a agorafobia desenvolve-se rapidamente porque o “medo de desamparo na eventualidade do pânico” acompanha o paciente onde quer que ele vá, 2) a agorafobia desenvolve-se lentamente mediante generalização do pânico situacional. A enorme variabilidade da latência da agorafobia sugere a existência de ambos os mecanismos. Estudos epidemiológicos de ampla escala sugerem, por outro lado, que existem 2 tipos de TP - “respiratório” ou “não respiratório” - dependendo da proeminência dos sintomas respiratórios (Briggs *et al.*, 1993; Roberson-Nay e Kendler, 2011; Roberson-Nay *et al.*, 2012). Em particular, enquanto o pânico respiratório caracteriza-se por dispneia, falta de ar, sensação de sufocamento e hiperventilação, o pânico não-respiratório apresenta sintomas similares àqueles do medo, incluindo palpitações, tremores e transpiração. O pânico respiratório também é precipitado pela administração dos metabólitos finais da respiração, dióxido de carbono (CO_2) e lactato de sódio (Adicionalmente, existem evidências (Briggs *et al.*, 1993) que os pacientes com pânico respiratório apresentam mais ataques espontâneos e respondam melhor à imipramina, enquanto os pacientes com pânico não-respiratório apresentem mais ataques situacionais e respondam melhor ao alprazolam.

Consequentemente, as principais teorias neurobiológicas sugerem que

os AP sejam alarmes falsos tanto à asfixia (Klein, 1993; Preter e Klein, 2014) quanto a uma ameaça iminente (Deakin e Graeff, 1991). Embora estas teorias não excluam a influência de processos cognitivos (corticais), elas sugerem que os AP sejam primariamente devidos à ativação errônea dos “alarmes biológicos” à asfixia ou ameaças próximas. Contudo, enquanto a teoria Deakin/Graeff (Deakin e Graeff, 1991; Graeff *et al.*, 1996; Canteras e Graeff, 2014) iguala o pânico a uma resposta intensa de medo, a teoria do alarme falso de sufocamento (Klein, 1993; Preter e Klein, 2008, 2014) afirma que o pânico clínico é similar ao medo da asfixia, diferindo do primeiro em vários aspectos. A última hipótese é fortemente apoiada pela ausência notável de respostas neuroendócrinas nos AP (Klein, 1993; Preter e Klein, 2008, 2014),

A teoria cognitiva é a principal competidora destas teorias. Segundo a teoria cognitiva os AP seriam devidos à “catastrofização” de sintomas corporais frequentes em qualquer tipo de ansiedade (Clark, 1986; Ehlers e Breuer, 1992, 1996; Ehlers *et al.*, 1986, 1988, 2000; Gelder *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1997). Ao invés de “disparos falsos” (*mistriggering*) de alarmes biológicos ao sufocamento ou a uma ameaça iminente (Deakin e Graeff, 1991; Klein, 1993), as teorias cognitivas sugerem que os AP sejam uma “interpretação falsa” (*misinterpretation*) de sintomas comuns à ansiedade. Mais notavelmente, pacientes de TP tenderiam a interpretar as palpitações, dispneia e sensações de falta de ar como sinais da iminência de um ataque cardíaco. Estas teorias sugerem que o processo de “catastrofização do sintoma” seja devido à retroalimentação positiva de processos (corticais) de percepção e avaliação do sintoma, resultando na piora do próprio sintoma. Estas teorias também têm sido evocadas como o fundamento das terapias cognitivas e comportamentais do

TP (Gelder *et al.*, 1993; Margraf *et al.*, 1993).

Não obstante, Beitman e colaboradores (Beitman *et al.*, 1987; Fleet *et al.*, 2000, 2003) observaram que existem AP sem medo. Num estudo de prevalência de pânico na emergência cardiológica, 41% de 104 pacientes com pseudoangina ou angina atípica foram diagnosticados como portadores do TP (Beitman *et al.*, 1987). No mesmo sentido, 32% de 38 pacientes de pânico com dor torácica não experimentaram nem medo intenso, nem medo de morrer, nem medo de perder o controle ou de enlouquecer, nos AP mais recentes e de maior gravidade (Beitman *et al.*, 1987). Por fim, Fleet e colaboradores (2000) compararam 333 pacientes cardíacos com 60 pacientes cardíacos com TP e com 48 pacientes cardíacos com TP sem medo. Notavelmente, os pacientes com TP comum apresentaram frequências maiores de TAG e agorafobia comparados aos pacientes de TP sem medo. Estes estudos sugerem que os AP podem ocorrer na ausência de sensações subjetivas de medo e de interpretações catastróficas dos sintomas cardíacos. Em vista destes dados, o presente estudo investigará as condições necessárias para o desenvolvimento do pânico situacional.

2. BASES NEURAIS DO MEDO CONDICIONADO A ESTÍMULOS E CONTEXTOS AVERSIVOS

Ao contrário do medo generalizado da agorafobia, o pânico situacional assemelha-se ao medo condicionado. Portanto, é de maior importância demonstrar se o pânico experimental é susceptível de condicionamento aos estímulos e contextos associados a pânico anteriores. Como os sintomas do pânico situacional são praticamente idênticos aos do pânico espontâneo (Krystal *et al.*, 1991), é igualmente importante verificar se as respostas do pânico condicionado são similares (fuga) ou distintas (congelamento) do pânico incondicionado e se os mecanismos neurais do pânico condicionado são similares àqueles do medo condicionado.

Décadas de pesquisa identificaram as áreas cerebrais que estão envolvidas no medo, extinção do medo, ansiedade e comportamentos defensivos relacionados. Estudos abundantes mostram que enquanto a amígdala e o hipocampo são cruciais na aquisição, consolidação, expressão e extinção do medo condicionado (Bannerman *et al.*, 2004; Cioocchi *et al.*, 2010; Davis, 1992; Haubensak *et al.*, 2010; Kheirbek *et al.*, 2013; LeDoux, 2012; LeDoux, *et al.*, 1990; Maren e Fanselow, 1996; Maren, 2014; Maren e Hobin, 2007), a matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) é fundamental na execução das respostas de medo tanto incondicionadas (Bittencourt *et al.*, 2004; Blanchard *et al.*, 1981; De Molina e Hunsperger, 1962; Schenberg *et al.*, 2005; Sudré *et al.*, 1993; Tovote *et al.*, 2016) quanto condicionadas (De Oca *et al.* 1998; Iwata *et al.*, 1986; LeDoux, *et al.*, 1990; Vianna *et al.*, 2001a,b). Estes estudos basearam-se nas relações temporais entre as intervenções experimentais (estímulos, lesões, drogas, etc) e o processo do condicionamento. Por exemplo, enquanto as intervenções realizadas antes do treinamento interferem com a aquisição da memória/resposta condicionada, intervenções realizadas imediatamente após o treinamento interferem com a consolidação da memória. Por sua vez, intervenções realizadas imediatamente antes ou após as sessões de teste interferem na expressão ou extinção da resposta, respectivamente. Note que embora o bloqueio da aquisição e/ou consolidação da memória resulte bloqueie a expressão da resposta condicionada, a expressão da resposta condicionada (congelamento, fuga) pode, no entanto, ser bloqueada a despeito de um condicionamento efetivo.

Em todo caso, evidências abundantes apoiam a participação da amígdala na aquisição do medo a um estímulo condicionado (CS) previamente

associado a um choque. Por exemplo, lesões da amígdala anteriores ao treinamento bloquearam a aquisição da respostas de medo tanto passiva (congelamento, supressão do comportamento de beber) quanto ativa (potenciação do susto a um ruído) a um CS (som, luz) (LeDoux 2000, 2012; Maren e Fanselow, 1996; Davis *et al.*, 2003). Estudos adicionais mostraram que enquanto as respostas de hipertensão e congelamento são processadas pelas projeções da amígdala ao hipotálamo e MCPA, respectivamente (Iwata *et al.*, 1986; LeDoux *et al.*, 1984, 1988, 1990), a potenciação do susto pelo medo seria processada por projeções da amígdala aos neurônios do núcleo reticular caudal da ponte que controlam o salto a um ruído intenso (Davis, 1992). Mais notavelmente, LeDoux e colaboradores (1986a,b) mostraram que embora condicionamento do medo a um CS sonoro dependa das projeções do tálamo auditivo (geniculado medial) à amígdala, o condicionamento ocorre independentemente da integridade do córtex auditivo, sugerindo, portanto, que o medo possa ser processado de forma subconsciente. Contudo, estudos com lesões seletivas dos núcleos da amígdala mostraram que estes núcleos desempenham papéis diferenciados na aquisição do medo condicionado. Em particular, enquanto as lesões (pré-treino) da amígdala lateral (AL) e central (ACe) bloquearam a aquisição do medo condicionado, lesões da amígdala medial (AMe), basolateral (ABL) e acessória (AA) foram ineficazes (Nader *et al.*, 2001). Adicionalmente, enquanto a lesão da AL bloqueou tanto o congelamento quanto a fuga a um som previamente pareado a um choque, lesões independentes da ACe e ABL bloquearam apenas um ou outro comportamento, respectivamente (Amorapanth *et al.*, 2000). Nos últimos experimentos, é importante notar que os autores utilizaram o mesmo estímulo

sonoro como estímulo condicionado aversivo (CS) para eliciação da resposta de congelamento, ou como reforçador negativo (R^-) da resposta de esquia numa caixa de vaivém (*shuttle-box*). Estes resultados apoiam a participação de núcleos diferenciados da amígdala na aquisição das respostas de medo de paradigmas tanto respondentes quanto instrumentais de forma similar, os núcleos da amígdala também exercem papéis diferenciados na expressão das respostas de medo. Embora Jimenez e Maren (2009) mostraram que as projeções da ABL à ACe são essenciais na expressão da resposta de congelamento, Amorapanth e colaboradores (2000) mostraram que enquanto as lesões pós-treino da ACe somente afetaram a resposta (passiva) de congelamento a um som, lesões pós-treino da ABL afetaram apenas a resposta (ativa) de fuga ao mesmo som, presumivelmente, mediante as projeções da ABL ao estriado. Adicionalmente, enquanto as lesões pós-treino da MCPA bloquearam a resposta de congelamento ao CS (som), elas não tiveram efeito algum na supressão do comportamento alimentar pela apresentação do mesmo CS (Amorapanth et al., 1999). Estes resultados sugerem que a MCPA não esteja implicada na supressão comportamental do conflito experimental, um paradigma clássico de ansiedade.

Por fim, estudos recentes de optogenética mostraram que enquanto a subdivisão lateral do núcleo central da amígdala (ACeL) seja necessária para a aquisição do medo condicionado, a subdivisão medial (ACeM) controla a expressão da resposta de congelamento mediante neurônios de projeção à MCPA (Ciocchi et al., 2010). Estes estudos sugerem que a plasticidade específica de neurônios fásicos e tônicos da ACeL para ACeM pode controlar a expressão e generalização do medo. Além dos estímulos salientes (*foreground*

stimuli), os contextos (*background stimuli*) são essenciais para lembrar o passado, interpretar o presente e antecipar o futuro. Estudos sobre aquisição e extinção do medo Pavloviano sugerem que os processos de aprendizagem e memória relacionados a contextos específicos envolvam o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal medial (Moscarello e Maren, 2018). Disfunções desta rede podem estar envolvidas em várias psicopatologias, incluindo crises de estresse pós-traumático, fobias específicas (acrofobia, agorafobia, claustrofobia) e pânico situacional. A participação do hipocampo na aquisição do medo contextual é apoiada pela demonstração de que as lesões do hipocampo dorsal atenuam a resposta de congelamento ao contexto sem interferir no congelamento a um CS que foi associado ao choque (Kim e Fanselow, 1992; Philips e LeDoux, 1992; Maren *et al.*, 1998). As lesões do hipocampo também prejudicam a aquisição do medo ao contexto num treinamento não-sinalizado (Kim *et al.*, 1993; Maren e Fanselow, 1997). Não obstante, McNish *et al.* (1997) mostraram que enquanto as lesões do hipocampo dorsal atenuam a resposta (passiva) de congelamento ao contexto, elas não tiveram efeito algum sobre a resposta (ativa) de potenciação do susto pelo contexto aversivo. McNish *et al.* (1997) sugeriram que ao invés de um déficit de aprendizado, a atenuação da resposta de congelamento seria devida à "competição" da resposta de congelamento com a hiperatividade devida às lesões do sistema septo-hipocampal (Gray e McNaughton, 2000). Embora McNish e colaboradores (1997) não tenham quantificado a atividade geral dos ratos hipocampais, eles mostraram que as lesões da amígdala atenuam tanto a resposta de congelamento quanto a potenciação do susto nos ratos expostos ao contexto aversivo. De fato, estudos subseqüentes mostraram que o medo

ao contexto aversivo é atenuado por lesões da amígdala realizadas tanto 1 dia quanto 7 dias após treinamentos leves ou intensivos (1 ou 25 pareamentos contexto-choque, respectivamente) (Maren, 1998).

A apresentação de comportamentos defensivos adequados em face da ameaça é essencial para a sobrevivência. Embora vários destes comportamentos sejam solidamente impressos (*hard-wired*), eles são passíveis de modulação, potenciação ou extinção. Por exemplo, enquanto o congelamento a um CS possa ser suprimido por extinção, a restauração das respostas extintas é altamente dependente do contexto, permitindo o desenvolvimento de respostas adequadas aos contextos de ameaças específicas. De fato, tanto animais quanto humanos evitam consequências nocivas se tiverem a oportunidade. Por exemplo, durante a aprendizagem da resposta instrumental de fuga, o congelamento deve ser suprimido para que o estímulo nocivo seja evitado. Dentre os mecanismos intrínsecos da amígdala, a inibição da resposta de congelamento pode ser efetuada por células da ACeL que inibem os neurônios de projeção da ACeM à MCPA (Haubensack *et al.*, 2010). Estas células estariam sob controle de influências extrínsecas do hipocampo e córtex pré-frontal (Moscarello e Maren, 2018). Especificamente, o hipocampo e o córtex pré-frontal medial seriam responsáveis pelo controle das respostas de congelamento e fuga mediadas pela excitação da amígdala (CS) e desinibição do núcleo accumbens (R^+), respectivamente.

Como a incapacidade de regular o medo e o comportamento defensivo é um componente central de vários transtornos de ansiedade, os circuitos cerebrais que promovem respostas flexíveis à ameaça são de grande significado clínico. Anormalidades destes circuitos podem desempenhar um

papel fundamental no pânico associado a várias condições psiquiátricas e, em particular, no pânico situacional.

21. Funções cognitivas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

As emoções são devidas a mudanças tanto internas quanto externas ao indivíduo. Na esteira da teoria cognitiva, Gross (2001) propôs que as emoções se desenvolvem segundo um processo “circular” que tem início numa alteração da *situação do indivíduo*, e prossegue pela *avaliação cognitiva* (processos de atenção e memória) e *respostas* (processos motivacionais) de aproximação ou aversão à nova situação. Contudo, a “raiva” compreende uma diversidade de respostas desencadeadas por conflitos ou ameaças, incluindo alterações somáticas perceptíveis como “*dificuldade de respirar*”, “*boca seca*”, “*tremor*” e “*mãos suadas*”. Consequentemente, a raiva não é independente das respostas corporais associadas.

Dentre as respostas endócrinas às situações aversivas, destaca-se a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O eixo HHA controla a secreção do cortisol, em humanos, e da corticosterona (CORT) em roedores e outras espécies (de Kloet *et al.*, 1998). A secreção dos corticosteroides é controlada pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) por meio da secreção do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) no sistema porta-hipofisário. Na hipófise, o CRH liga-se a receptores específicos dos corticotrófos, promovendo a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual estimula a secreção dos CORT pelo córtex adrenal (de Kloet *et al.*, 1998). Os CORT também apresentam enormes variações circadianas, com picos nos períodos de maior atividade tanto das espécies diurnas (humanos)

quanto noturnas (roedores) (Spiga *et al.*, 2014). Embora o eixo HHA tenha funções amplas na fisiologia normal do organismo, incluindo tanto a regulação do metabolismo de carboidratos, gordura e proteínas (Dallman *et al.*, 1993, 2007) quanto a função imunológica (Busillo e Cidlowski, 2013), um dos aspectos mais investigados do eixo HHA é a sua ativação em virtualmente todas as situações aversivas (Graeff *et al.*, 2005; Herman *et al.*, 2016; Selye, 1936). O eixo HHA é controlado por alças de retroalimentação longa e curta que inibem a secreção de CRH e ACTH, no PVN e na hipófise anterior, respectivamente. Os CORT aumentam bruscamente após o estresse e penetram no cérebro com facilidade, ligando-se aos receptores citosólicos de alta afinidade do tipo mineralocorticoide (MR) (também chamados de receptores de CORT, ou CR), que estão localizados principalmente no hipocampo e septo lateral, e a receptores glicocorticoides (GR) de afinidade 10 vezes menor, que apresentam distribuição um pouco mais ampla que a dos MR (de Kloet *et al.*, 1998). Quando ativado, o GR dissocia-se da chaperona HSP e migra para o núcleo, onde se liga aos elementos de resposta hormonal (HREs) no ADN ou interage com outros fatores de transcrição, alterando a expressão gênica por diversos mecanismos (Guiochon-Mantel *et al.*, 1996, apud Pariente e Miller, 2001).

No cérebro, o PVN é fortemente inibido por aferências do hipocampo e córtex pré-frontal (Radley *et al.*, 2009; Radley e Sawchenko, 2011, 2015). Acredita-se, portanto, que enquanto a regulação do eixo HHA no repouso ocorre pela sub-regulação de MR que estão totalmente ocupados na maioria das condições (ocupância > 90% na manhã, noite ou estresse), a regulação do eixo HHA no estresse seria devida à ocupação dos GR, que estão virtualmente

desocupados na manhã (ocupância de 10%) e moderadamente ocupados na noite e no estresse (ocupâncias de 67% e 74%, respectivamente) (Reul e de Kloet, 1985; de Kloet *et al.*, 1998). Foi proposto que o desequilíbrio das funções complementares dos MR e GR resultaria em transtornos emocionais, incluindo o estresse pós-traumático (Rimmele *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

Notavelmente, enquanto o eixo HPA é quiescente nas duas primeiras semanas de vida, ele torna-se responsivo após um único episódio de privação materna de 24 h no 3º ou 10º dia pós-natal (PN) (Levine *et al.*, 1991; ,b, 1995; Ladd *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1997). Embora o eixo HHA possa ser permanentemente alterado por situações estressantes em períodos críticos da infância, Daskalakis e colaboradores (2011) mostraram que a resposta do eixo HPA dos filhotes sofre rápida habituação após separações maternas diárias se os filhotes permanecem em suas gaiolas. Também existem evidências que o CRH e os CORT desempenhem um papel essencial na atenção e aquisição das respostas comportamentais ao estresse. Por exemplo, Reul e de Kloet (1985) mostraram que enquanto a ativação dos MR aumenta a flexibilidade comportamental e a sensibilidade do animal ao estresse, a ativação dos GR facilita a consolidação de memórias traumáticas (Oitz e De Kloet, 1992; Souza *et al.*, 2014). Não surpreendentemente, estes receptores estão localizados em áreas do cérebro envolvidas na regulação emocional, aprendizagem e memória (Joels *et al.*, 2006; Brinks *et al.*, 2009.; de Kloet *et al.*, 1988; de Kloet, 2014). Em particular, o hipocampo é extremamente vulnerável tanto ao estresse (isquemia, estimulação repetitiva, etc) e administração crônica de glicocorticoides exógenos (Watanabe *et al.*, 1992) quanto à hipercortisolemia da síndrome de Cushing, na qual são observadas lesões devidas à retração de

processos dendríticos, inibição da neurogênese, neurotoxicidade e atrofia (Sapolsky, 2001). O CRH e seus receptores também são encontrados em regiões cerebrais associadas às respostas de atenção, memória e ansiedade (Sherman e Kalin, 1988).

A importância fundamental dos CORT para a consolidação da memória aversiva foi demonstrada para resposta de imobilidade no teste de natação forçada (TNF) (Veldhuis *et al.*, 1985; de Kloet *et al.*, 1988; de Kloet e Molendijk, 2016). Em particular, estes autores apresentaram evidências de que a ativação dos MR do hipocampo reduz o efluxo dopaminérgico ao núcleo acumbens e córtex prefrontal, promovendo a transição das respostas ativas (nadar, mergulhar, galgar as paredes) para a resposta passiva (boiar). Por sua vez, a retenção da imobilidade seria devida à ativação dos GR do giro denteado do hipocampo (de Kloet *et al.*, 1988). Em particular, as microinjeções hipocampais do antiglicocorticoide mifepristona após a sessão-treino (TNF-1) bloqueiam a expressão da resposta de imobilidade na sessão-teste (TNF-2) do dia seguinte. Adicionalmente, embora o comportamento de boiar dos ratos adrenalectomizados seja normal em TNF-1, ele é dramaticamente reduzido em TNF-2 (Veldhuis *et al.*, 1985). O comportamento de boiar é, no entanto, restaurado de forma dose-dependente em ratos adrenalectomizados tratados com CORT 15 min após TNF-1. Tal como ocorre nos pacientes com DM, pacientes com TP apresentam hiperatividade basal do eixo HHA. Esta hiperatividade é demonstrada pela resposta aumentada de CORT à administração de CRH em indivíduos pré-tratados com uma dose baixa de dexametasona (teste DEX/CRH) (Schreiber *et al.*, 1996) (Fig.2).

Notavelmente, no entanto, o eixo HHA não é ativado nem nos ataques

espontâneos ou situacionais de humanos (Cameron *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1988), nem nos ataques experimentais de humanos (Hollander *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1987; Liebowitz *et al.*, 1985; Sinha *et al.*, 1999) e animais (Klein *et al.*, 2010; de Souza Armini *et al.*, 2015; Schenberg *et al.*, 2008). Como a ativação do eixo HHA é esperada em situações de perigo que possam envolver gastos energéticos, a ausência de respostas neuroendócrinas nos AP é um dos fatos mais intrigantes da psiquiatria.

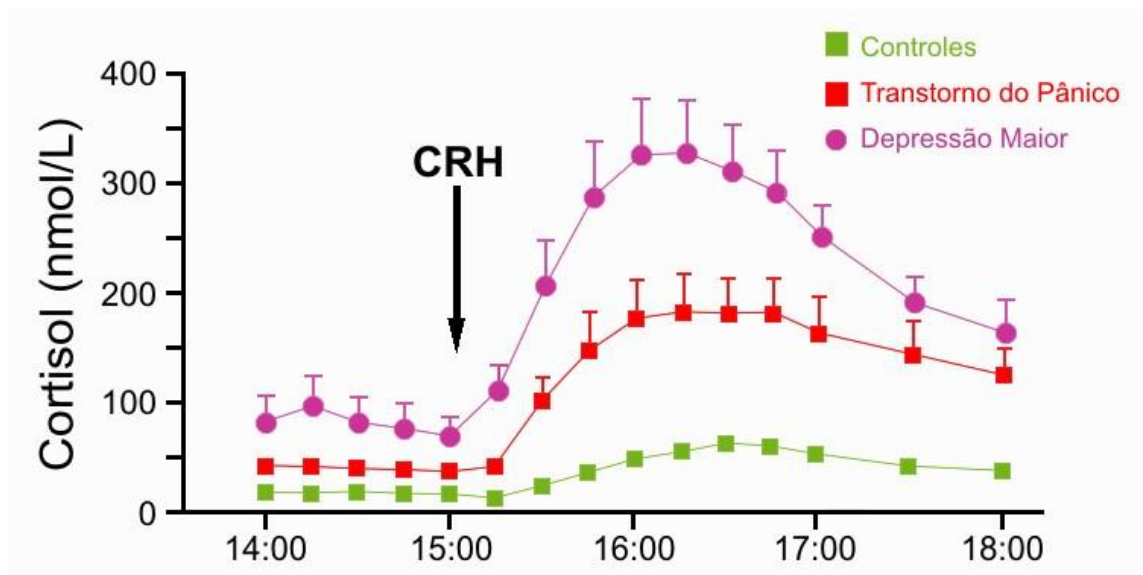


Figura 2. Resposta do cortisol ao teste CRH/dexametasona em controles saudáveis, pacientes de pânico simples e pacientes com depressão maior. Os grupos foram administrados com 1 mg de dexametasona no dia anterior à administração do fator liberador da corticotrofina (CRH) (modificado de Schreiber *et al.*, 1996).

Dentre várias explicações, Klein (1993) sugeriu que o aumento da secreção dos CORT causaria aumentos do consumo de oxigênio que seriam contraproducentes numa situação de sufocamento. Contudo, Raff e colaboradores (1986, 1988) mostraram que o eixo HHA é ativado na hipóxia, na hipercapnia e, principalmente, na hipóxia-hipercápica que é a condição mais próxima à asfixia. A ausência de respostas neuroendócrinas seria,

portanto, uma característica do pânico clínico e não do sufocamento.

Também foi sugerido que a ausência das respostas neuroendócrinas deve-se aos processos adaptativos à hiperatividade do eixo HHA (Woods *et al.*, 1987). Não obstante, Petrowski e colaboradores (2010, 2013) mostraram que pacientes que sofreram apenas 1 ou 2 ataques e que apresentavam resposta normal de CORT ao despertar, apresentavam respostas neuroendócrinas reduzidas no teste de estresse social. Estes dados sugerem que o eixo HHA dos pacientes de pânico somente esteja hiporresponsivo nas situações de estresse agudo. Há, no entanto, uma terceira hipótese. Como os CORT estão envolvidos tanto na aquisição das respostas de manejo do estresse (*stress coping*) quanto na consolidação da memória aversiva (Veldhuis *et al.*, 1985; de Kloet *et al.*, 1988; de Kloet e Molendijk, 2016), a inibição do eixo HHA durante os AP poderia ser um mecanismo de proteção do paciente contra o desenvolvimento de pânico situacional, agorafobia ou estresse pós-traumático, impedindo a consolidação da memória traumática. Durante os AP, a inibição do eixo HHA poderia ser mediada por projeções colecistocinérgicas da MCPA ao PVT, e deste ao PVN (Bhatnagar *et al.*, 2000). Portanto, o presente estudo também investigará o efeito do aumento dos níveis de CORT no desenvolvimento de pânico situacional em ratos.

2.2 Papel da matéria cinzenta periaquedutal nos ataques de pânico

Embora a amígdala ocupe um papel central em várias teorias sobre o TP (Gorman *et al.*, 2000; Ziemann *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2014), pacientes com doença de Urbach-Wiethe que têm calcificações bilaterais extensas da amígdala e que não se recordam de experiências de medo, desenvolvem AP

tanto espontaneamente (Wiest *et al.*, 2006) quanto experimentalmente à inalação de 35% de CO₂ (Feinstein *et al.*, 2013). Consequentemente, Feinstein e colaboradores (2013) sugeriram que o pânico seja mediado “no tronco cerebral” a despeito do papel estabelecido da amígdala e do hipocampo no processamento do medo e da ansiedade em homens e animais. No mesmo sentido, evidências abundantes sugerem que os AP sejam devidos à ativação da MCPA (Deakin e Graeff, 1991; Schenberg *et al.*, 2001; Canteras e Graeff, 2014; Schenberg *et al.*, 2014; Schenberg, 2016; Graeff, 2017). A MCPA é, no entanto, uma estrutura heterogênea composta de colunas morfofuncionais situadas nas posições dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl), lateral (MCPAl) e ventrolateral (MCPAvl) ao aqueduto (Bandler e Depaulis, 1991; Bittencourt *et al.*, 2004; Keay e Bandler, 2004; Ruiz-Torner *et al.*, 2001) (Fig.3). Como as estimulações elétricas, químicas e optogenéticas das 3 primeiras colunas produzem comportamentos robustos de defesa (congelamento e fuga) acompanhados de respostas autonômicas intensas (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2016; Tovote *et al.*, 2016), estas colunas têm sido genericamente denominadas de “matéria cinzenta periaquedutal dorsal” (MCPD) e são apontadas como o principal substrato dos AP.

Mais notavelmente, estimulações elétricas da MCPD de humanos produzem sintomas virtualmente idênticos aos dos AP, incluindo ansiedade intensa, desejo de fugir, dispneia, palpitações, aperto no peito, medo de morrer e sensações de sufocamento ou falta de ar (Nashold *et al.*, 1969; Amano *et al.*, 1978; Kumar *et al.*, 1997; Young, 1989). A MCPD também foi intensamente ativada em voluntários relatando tanto dispnéia e sensações de falta de ar à

inalação de 8% de CO₂ (Brannan *et al.*, 2001) quanto medo de um ataque de um predador virtual capaz, no entanto, de desferir choques reais ao dedo do indivíduo (Mobbs *et al.*, 2007).

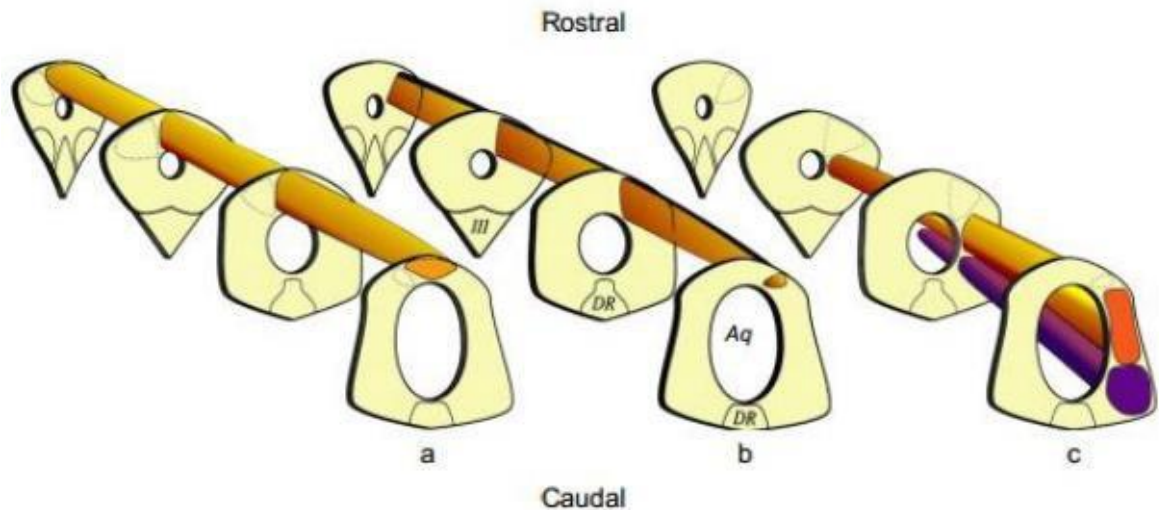


Figura 3. Organização colunar da matéria cinzenta periaquedutal. As figuras ilustram as colunas: (a) dorsomedial, (b) dorsolateral, (c) lateral (acima) e ventrolateral (abaixo). Abreviaturas: Aq, aqueduto cerebral; DR, núcleo dorsal da rafe; III, núcleo óculo-motor (modificado de Bandler *et al.*, 1991).

No mesmo sentido, os comportamentos de defesa à estimulação da MCPD de ratos foram marcadamente atenuados por antidepressivos tricíclicos (ADT) e inibidores seletivos da recaptura da serotonina (ISRS) em doses e regimes similares aos da terapia do TP (Schenberg *et al.*, 2001). Em contraste, as administrações agudas de ADT, ISRS, maprotilina, buspirona e benzodiazepínicos tradicionais não tiveram efeito algum, tal como ocorre na clínica. Mais importante, de Souza Armini e colaboradores (2015) mostraram que estas respostas não são acompanhadas pela ativação do eixo HHA, uma característica estigmática do pânico clínico (Hollander *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1987; Liebowitz *et al.*, 1985; Sinha *et al.*, 1999; Graeff *et al.*, 2005). Estes resultados sugerem que as respostas à estimulação da MCPD sejam distintas

das respostas de medo processadas na amígdala. Estas diferenças são particularmente nítidas em ratos submetidos ao abrasamento (*kindling*) da amígdala. De fato, Tannure e colaboradores (2009) mostraram que embora estes ratos apresentem limiares reduzidos de defesa à aproximação do experimentador (resistência à captura), eles apresentam limiares aumentados à estimulação da MCPD. Em contraste, estudos de nosso laboratório mostraram que os limiares do pânico experimental à estimulação da MCPD estão reduzidos em ratos adultos que foram submetidos ao isolamento social neonatal ou privação materna na infância (Borges-Aguiar *et al.*, 2018; Quintino-dos-Santos *et al.*, 2014), reproduzindo observações clínicas de que indivíduos que sofreram ansiedade de separação da infância apresentam risco aumentado de desenvolvimento do TP na vida adulta (Klein, 1964; Roberson-Nay *et al.*, 2012; McLaughlin *et al.*, 2010). Mais notadamente, nossos estudos também mostraram que a MCPA abriga um sistema de alarme à hipóxia que é sensibilizado pela pré-exposição à hipercapnia e inibido por tratamentos clinicamente eficazes com os panicolíticos fluoxetina, clonazepam e alprazolam (Schimitel *et al.*, 2012, 2014; Casanova *et al.*, 2013; Spiacci *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2017). No conjunto, esses estudos sugerem que a MCPA seja o substrato dos AP respiratórios e não-respiratórios (Canteras and Graeff, 2014; Schenberg *et al.*, 2014; Schenberg, 2016; Graeff, 2017).

3. DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE PÂNICO SITUACIONAL

3.1. PAPEL DA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL NO MEDO CONDICIONADO

Evidências abundantes sugerem que a MCPA seja uma estrutura essencial na execução das respostas de defesa tanto incondicionadas quanto condicionadas (Bittencourt *et al.*, 2004; Blanchard *et al.*, 1981; De Molina e Hunsperger, 1962; De Oca *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2016; Iwata *et al.*, 1986; LeDoux, *et al.*, 1990; Schenberg *et al.*, 2005; Tovote *et al.*, 2016; Vianna *et al.*, 2001a). Em particular, estudos recentes de optogenética mostraram que a MCPD abriga populações especializadas de neurônios que disparam exclusivamente antes (detecção da ameaça) ou depois da deflagração da resposta de fuga (Deng *et al.*, 2016). Os estudos de optogenética também adicionaram novas evidências de que as respostas de medo condicionado codificadas na amígdala são mediadas por projeções inibitórias da MCPAvl aos neurônios glutamatérgicos da formação reticular medial do bulbo que se projetam à medula espinhal (Tovote *et al.*, 2016).

Vianna e colaboradores (2001) mostraram, no entanto, que as respostas de defesa à estimulação da MCPAdl não são afetadas nem pela lesão da MCPAvl, nem pela alteração do contexto da estimulação. De fato, existem evidências de que a resposta de congelamento seja até facilitada pelas lesões da MCPAdl (De Oca *et al.*, 1998). Em contraste, o medo condicionado a um som que foi pareado ao choque foi abolido pela lesão da MCPAvl (Vianna *et al.*, 2001). No conjunto, estes resultados confirmam tanto a existência de

sistemas distintos de defesa nas regiões dorsal e ventral da MCPA quanto o caráter incondicionado das respostas de defesa à estimulação da MCPAdl. Adicionalmente, a insensibilidade das respostas eliciadas pela estimulação da MCPAdl à alteração do contexto é consistente com a ausência de conexões da MCPAdl com a ACe (Rizvi *et al.*, 1991) e regiões do hipocampo (Keay e Bandler, 2004) presumidamente envolvidas no processamento do medo a estímulos condicionados e contextos, respectivamente (Bannerman *et al.*, 2003, 2004; Kheirbek *et al.*, 2013). Não obstante, a MCPAdl estabelece conexões profusas com as camadas profundas do colículo superior que integram respostas visuomotoras com diversas modalidades sensoriais (Redgrave e Dean, 1991). A MCPAdl também é recipiente de informações olfativas da presença de predadores codificadas na AMe e nos núcleos hipotalâmicos anterior, ventromedial e premamilar dorsal (Gross e Canteras, 2012). Os últimos autores também apresentam evidências de que a estimulação da MCPD pode suportar o condicionamento de medo aos contextos associados ao predador mediante conexões indiretas com o hipocampo. De fato, estudos de conectividade funcional em humanos sugerem que o hipocampo esteja “funcionalmente” conectado a todas as colunas da MCPA (Coulombe *et al.*, 2016).

Embora a MCPA seja tradicionalmente interpretada como uma “via final comum” do processamento das respostas de medo (Fernandez de Molina e Hunsperger, 1962; De Oca *et al.*, 1998; Fanselow, 1991; Iwata *et al.*, 1986; LeDoux, *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 2006; Tovote *et al.*, 2015, 2016), estudos recentes sugerem que ela também possa estar envolvida na aquisição do medo condicionado, transmitindo as informações nociceptivas para a amígdala

e outras estruturas prosencefálicas (Kim *et al.*, 2013; Vianna *et al.*, 2003a,b). Esta possibilidade é apoiada pela demonstração de ativação da MCPAI por estímulos nociceptivos (Keay e Bandler, 2004) e pelas conexões recíprocas da ACe com todas as colunas da MCPA, exceto a MCPAdI (Rizvi *et al.*, 1991).

Em particular, existem evidências convincentes da aquisição de medo condicionado tanto aos estímulos discretos (som, luz) (Di Scala *et al.*, 1987; Castilho *et al.*, 2001, 2002) quanto aos contextos (Kim *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2016) que foram pareados às estimulações elétricas, químicas e optogenéticas da MCPA.

De fato, Johansen e colaboradores (2010) mostraram que a inativação da PAG atenuou os disparos de neurônios amigdalares à aplicação de um choque, prejudicando a aquisição do medo condicionado. Mais notavelmente, a expectativa da aplicação do choque inibiu a atividade dos neurônios da ABL e MCPA. Estes dados indicam que a MCPA pode ser um relé importante na transmissão de sinais instrutivos para a amígdala.

No mesmo sentido, Kim e colaboradores (2013) mostraram que enquanto as lesões ou inativações farmacológicas da ABL bloquearam as respostas de fuga à estimulação da MCPD, as lesões da MCPD não tiveram efeito algum sobre as respostas de congelamento à estimulação da ABL. Adicionalmente, mostraram que enquanto as estimulações da MCPA e BLA são ineficazes como estímulos incondicionados, as estimulações da MCPD suportam condicionamento de medo (ao som e contexto) que é abolido por lesões da ABL. Não obstante, tanto a estimulação da MCPD quanto a estimulação da ABL eliciaram a fuga para o ninho durante uma tarefa de forrageamento num contexto seminatural. Por fim, Kim e colaboradores (2013)

mostraram que a pré-estimulação (*priming*) da MCPD modula a plasticidade das sinapses da via subículo-amigdalár. No conjunto, estes resultados sugerem que a ABL encontra-se a jusante da MCPD, contrariando a visão tradicional de que a última estrutura seja somente uma “via final comum” dos comportamentos de defesa. Contudo, é importante notar que enquanto Kim e colaboradores (2013) realizaram pareamentos simultâneos da estimulação da MCPD ao som e ao contexto, Deng e colaboradores (2016) parearam a estimulação da MCPD a contextos marcadamente diferentes. Portanto, as respostas de congelamento de ambos os estudos podem ter sido devidas a um condicionamento de segunda ordem, no qual a estimulação da MCPD foi associada ao estímulo condicionado (som) ou aos estímulos salientes do contexto (tácteis ou visuais), e não ao contexto propriamente dito. Mais importante, no entanto, Kim e colaboradores (2013) não realizaram grupos controles (estimulação intracraniana fictícia). Portanto, não podemos nem mesmo afirmar se houve eliciação das respostas condicionadas de congelamento ou locomoção nos ratos estimulados na MCPD ou na MCPAvl e ABL. De fato, Kim e colaboradores (2013) relataram que os ratos apresentaram apenas 30% de congelamento durante exposições de 8 min ao tom ou ao contexto que foram pareados à estimulação da MCPD (Kim *et al.*, 2013). Estes resultados podem representar os períodos normais de quiescência do rato. Estas dúvidas são agravadas pelo registro automático da resposta de congelamento.

Não obstante, Zanolini e colaboradores (2007) relataram que apenas 2 estimulações químicas da MCPD em dias consecutivos foram suficientes para o desenvolvimento da resposta de esquia ao local da estimulação (*conditioned*

place aversion). Adicionalmente, mostraram que a re-exposição ao local da estimulação química causou aumentos pequenos, porém significantes, da expressão da proteína c-fos na MCPAdm, na ABL e no núcleo laterodorsal do tálamo. Propuseram, portanto, que o medo condicionado ao contexto da estimulação da MCPD seja processado por projeções da MCPAdm ao tálamo laterodorsal e deste à amígdala. Portanto, que o medo condicionado ao contexto da estimulação da MCPD seja processado por projeções da MCPAdm ao tálamo laterodorsal e deste à amígdala.

Alternativamente, o desenvolvimento do medo contextual poderia ser bloqueado pela inibição aparente do eixo HHA durante os AP. Embora o eixo HPA não seja ativado nos AP clínicos e experimentais, de humanos e animais, Borelli e colaboradores (2013) relataram que microinjeções de doses baixas de CRH na MCPA aumentaram a resposta de congelamento, pressão arterial e frequência cardíaca de ratos re-expostos ao contexto de aplicação de um choque nas patas. Adicionalmente, a microinjeção da dose mais baixa na MCPAvl (mas não na MCPD) produziu um aumento pronunciado do susto potenciado pelo medo. A estimulação da MCPD poderia levar ao desenvolvimento do medo condicionado no caso de uma eventual ativação do eixo HHA.

Embora os estudos acima sugiram que a estimulação da MCPD possa servir de estímulo incondicionado para a aquisição do medo contextual, as sessões-testes destes estudos foram realizadas apenas 1 ou 2 dias após a

última sessão de treinamento (Kim *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2016; Zanoveli *et al.*, 2007). Adicionalmente, o condicionamento ao contexto na ausência de estímulos discriminativos só foi demonstrado por Zanoveli e colaboradores (2007). Portanto, não existem informações sobre o tempo de retenção da resposta de medo condicionado ao contexto da estimulação da MCPD. Tampouco existem informações sobre os efeitos do nível basal de estresse e/ou da atividade do eixo HHA na retenção desta resposta.

Por outro lado, achados recentes indicam que os glicocorticoides exercem influências complexas e, frequentemente, rápidas em fases distintas dos processos mnemônicos. Especificamente, enquanto os glicocorticoides facilitam a consolidação da memória de experiências de forte conteúdo emocional, eles prejudicam a recuperação da memória operacional e contextual em situações aversivas. Além disso, evidências crescentes indicam que os diferentes efeitos dos glicocorticoides dependem de uma interação não-genômica mediada pela ativação dos sistemas noradrenérgico e endocanabinoide da amígdala basolateral e hipocampo (Atsak *et al.*, 2012a,b; Atucha *et al.*, 2017). Enquanto os efeitos tardios dos glicocorticoides são mediados por mecanismos esteroides clássicos de regulação da transcrição, os efeitos relativamente rápidos dos glicocorticoides são mediados por um ou mais receptores de membrana acoplados à proteína G que podem, por outro lado, influenciar a transcrição gênica (Tasker *et al.*, 2006).

Em vista destes fatos, o presente estudo examinou a aquisição e recuperação da resposta condicionada ao contexto da estimulação da MCPD em testes realizados imediatamente após ou 90 min após o estresse de restrição ou a administração de CORT.

3.2 OBJETIVO

O presente projeto examinou algumas das condições que poderiam ser necessárias para o desenvolvimento do pânico situacional.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se os ratos desenvolvem respostas condicionadas ao contexto da estimulação elétrica da MCPD na ausência de quaisquer estímulos discriminativos.
2. Verificar se os ratos desenvolvem respostas condicionadas ao contexto no qual foram aplicados choques subcutâneos na ausência de quaisquer estímulos discriminativos. Verificar os efeitos do estresse de restrição (10 min) aplicado imediatamente antes da sessão de estimulação elétrica da MCPD, na aquisição da resposta condicionada ao contexto da estimulação.
3. Verificar os efeitos do estresse de restrição (10 min) aplicado 90 min antes da sessão de estimulação elétrica da MCPD, na aquisição da resposta condicionada ao contexto da estimulação.
4. Verificar os efeitos da CORT (10 mg/kg) administrada imediatamente antes da sessão de estimulação elétrica da MCPD na aquisição da resposta condicionada, avaliando, portanto, os efeitos dos glicocorticoides em receptores de membrana.
5. Verificar os efeitos da CORT (10 mg/kg) administrada 90 min antes da sessão de estimulação elétrica da MCPD na aquisição da resposta condicionada, avaliando, portanto, os efeitos dos glicocorticoides em receptores nucleares.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) (n = 150), machos, pesando entre 250 e 300 g, fornecidos pelo biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos foram alojados em grupos de 5 sujeitos por gaiola (49 cm x 34 cm x 16 cm) com assoalho coberto com maravalha e água e comida *ad libitum*, num ambiente com som (45 dB) e temperatura (20-25°C) controlados e ciclo de iluminação de 12 h (luzes acessas às 6:00 h).

3.4.2 Eletrodos intracranianos

Os eletrodos foram confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 µm de diâmetro, isolado em toda extensão exceto na seção transversal de sua extremidade livre (California Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA). Um outro fio de aço inoxidável, não isolado, serviu como eletrodo indiferente. Os eletrodos foram soldados a um soquete de circuito integrado (BCPT 50, Cromatek, Guarulhos, SP, Brasil).

3.4.3 Eletrodos subcutâneos

Os eletrodos subcutâneos foram confeccionados com segmentos curtos (5 mm) de agulhas hipodérmicas (nº 7.5) soldados a um fio flexível isolado em toda extensão.

3.4.4. Implantação de eletrodos intracranianos

Os ratos foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (0,25 g/kg, I.P., Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), pré-tratados com ceftriaxona sódica (30 mg/kg,

I.M. Novaquímica Sigma Pharma, Hortolândia, Brasil) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M., Medley-Sanofi, Campinas, Brasil) e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) montado sobre uma placa térmica (35°C-36°C). Após a assepsia da parte superior da cabeça com álcool 70° e tintura de iodo, removia-se uma pequena área da pele e tecidos subcutâneos, expondo-se a calvária desde o bregma até o lambda (evitou-se a tricotomia para proteger a pele das lesões produzidas pela autolimpeza). Após a raspagem da gálea aponeurótica, foram feitos 4 orifícios (2 nos ossos parietais e 2 no osso interparietal), com o auxílio de uma broca odontológica, para a fixação de pequenos parafusos de aço inoxidável para ancoragem da prótese. A seguir realizou-se um orifício na -2,1 mm lateralmente e - 7,8 mm posteriormente ao bregma para introdução do eletrodo dirigido à MCPD, num ângulo de 15°, até a profundidade de 5 mm abaixo da superfície óssea. Após a soldagem do eletrodo indiferente a um parafuso de fixação e a limpeza e secagem da calota craniana, o campo cirúrgico foi preenchido com resina acrílica autopolimerizável e os ratos foram colocados numa placa térmica (32°C) até se recuperarem da anestesia.

3.4.5. Implantação de eletrodos subcutâneos

Os ratos anestesiados foram fixados ao aparelho estereotáxico para exposição e limpeza da calvária. Os eletrodos subcutâneos foram introduzidos sob a pele da nuca do animal e conduzidos aos flancos direito e esquerdo com o auxílio de um trocarte. A extremidade livre dos eletrodos foi soldada a um soquete que era fixado ao crânio com 4 parafusos de aço inox e resina acrílica autopolimerizável, tal como na implantação dos eletrodos intracranianos.

3.4.6. Caixa de Estimulação (CE)

Tanto as estimulações intracranianas (EIC) quanto os choques subcutâneos (CSC) foram aplicados numa caixa retangular com 60 cm de aresta e porta e teto de acrílico transparente. A caixa tinha paredes brancas e um espelho ao fundo (60 cm x 30 cm) que auxiliava na observação das respostas do rato. O assoalho era coberto por uma lona de plástico preto, ligeiramente áspero, subdividida em 16 espaços iguais. Quando fechada, a porta (“guilhotina”) deixava uma fresta superior de 5 cm que auxiliava na ventilação do ambiente. Após as sessões, a lona do assoalho era lavada com água e detergente. A caixa dispunha de uma microcâmara fixada ao teto (Topway TW3100-CA, Color CCD 1/3, lente 3,6mm), acoplada a um computador, que possibilitava a filmagem dos comportamentos para análise *off-line*.

3.4.7. Determinação do limiar de fuga à estimulação elétrica da MCPD

Os limiares de fuga à estimulação intracraniana (EIC) foram determinados 4 semanas após a neurocirurgia (D28). Para isto, os ratos eram conectados ao cabo de estimulação, colocados na CE e estimulados com pulsos senoidais (60 Hz, 30 s, a.c.) de intensidades crescentes, em passos de 5 μ A, até que apresentassem a resposta fuga (trotes, galopes e/ou saltos). Um conector giratório de mercúrio fixado ao teto da CE permitia a livre movimentação dos ratos.

3.4.8. Determinação do limiar de contorção ao choque subcutâneo

Os limiares de contorção também foram determinados 28 dias após a

cirurgia. Para isto, os ratos eram colocados na CE e recebiam choques subcutâneos (30 s, 0-7 V, a.c) de voltagem crescente, em passos de 2 V, até a apresentação da resposta de contorção.

3.4.9. Estresse de restrição

Dois grupos foram submetidos a 10 min de restrição em tubos de PVC com 6,5 cm de diâmetro interno e 20 cm de comprimento. Os tubos tinham uma tampa fixa com 5 orifícios que permitiam a respiração do rato e, na outra extremidade, uma tampa móvel, ajustável ao tamanho do rato, com um orifício para passagem da cauda. Estudos nossos e de outros pesquisadores mostram que o estresse de restrição causa ativações acentuadas do eixo HHA (Hauger *et al.*, 1988; Schenberg *et al.*, 2008).

3.4.10. Tratamento com corticosterona (CORT)

Dois grupos foram tratados com corticosterona (I.P.), 90 min e imediatamente antes da exposição dos ratos à CE. A CORT β ,21- diol-2,20-diona, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foi dissolvida a 45°C em hidroxiestearato de polietilenoglicol 15 (Solutol HS15 TM, Kolliphor®, BASF Corporation, Florham Park, EUA). A solução resultante (20 mg/mL) foi completada com salina (NaCl 0,9%, 50% v/v) e agitada vigorosamente, resultando numa suspensão finamente particulada de 10 mg/mL de CORT.

3.4.11. Registros comportamentais

Os comportamentos dos ratos nas sessões de determinação dos limiares e nas exposições à CE foram registrados de acordo com o seguinte

etograma:

Dormir – Postura horizontal com olhos fechados, sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros. *Repouso* – Postura horizontal com olhos semi-abertos ou abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros. O rato pode apresentar uma postura de “esfinge”, com o tronco rebaixado e pescoço e cabeça erguidos.

Autolimpeza – Manipulação repetitiva dos pelos da cabeça, tronco e genitais usando as patas dianteiras ou a boca (comportamentos autodirigidos).

Olfação – Exploração olfativa do ambiente indicada pelo movimento das narinas e das vibrissas e movimentos pendulares da cabeça em posição elevada.

Esquadrinhar – Exploração visuomotora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfação.

Avaliação de risco – Exploração do ambiente com breves alongamentos do tronco (*stretch-attending*), olfação e esquadrinhamento.

Levantar – Postura ereta, com extensão das patas posteriores.

Locomoção – Deslocamento lento do animal por, pelo menos, dois espaços do assoalho da arena, mediante a projeção

simultânea das patas contralaterais anterior e posterior.

Imobilidade tensa – Cessar brusco de todos os movimentos, frequentemente acompanhado de extensão dos membros (elevação do tronco), orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades pode resultar em posturas anômalas.

Trote – Esta resposta (e/ou galope ou salto) foi utilizada na determinação do limiar da fuga à estimulação da MCPD. O trote consiste no deslocamento rápido do animal mantendo o padrão contralateral da locomoção.

Galope – Deslocamento rápido com a projeção alternada dos pares de patas dianteiras e traseiras.

Saltos – Impulsos verticais, freqüentemente, em direção à borda superior da arena.

Exoftalmia – Abertura máxima das pálpebras (contração do músculo tarso palpebral) e protrusão do globo ocular (contração do músculo orbital), o qual assume aspecto esférico e cor brilhante indicativa de uma maior entrada de luz. Estas respostas resultam no aumento do campo visual e apresentam um sinergismo evidente com a midríase, também de natureza simpática, que ocorre durante a reação de defesa natural ou induzida por estimulação intracraniana.

Defecação e Micção – Eliminação de fezes e urina.

Contorção – A resposta de contorção foi utilizada como limiar aversivo do choque. Esta resposta consistia numa contração

da musculatura do dorso seguida de um brusco recuo, movimentos com os membros anteriores e locomoção trôpega. A contorção era tanto precedida quanto seguida de respostas de congelamento, na vigência de choques subliminares ou após os choques supraliminares, respectivamente.

Os comportamentos durante as exposições à CE somente foram quantificados nos 6 minutos iniciais dos vídeos de 10 minutos de duração. Foram quantificados os comportamentos de autolimpeza, levantar, locomoção, imobilidade, dormir, repouso e defecação. A locomoção foi medida pelo número de espaços do assoalho que foram invadidos durante a exposição ou re-exposição à Ce. A duração da imobilidade (repouso e/ou dormir), bem como a frequência de autolimpeza, levantar e defecação (número de bolos fecais), também foram quantificadas.

3.4.12. Histologia

Após a decapitação, as cabeças eram mantidas por aproximadamente 10 dias em solução de formaldeído 10%. Em seguida, os cérebros eram removidos e mantidos por 2 dias adicionais em formaldeído 10%. Os blocos do mesencéfalo foram seccionados num micrótomo de congelamento (Leica DM 2500, Wetzlar, Alemanha) em cortes de 40 µm de espessura. Os cortes foram estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e montados com DPX (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados e fotografados por microscopia de baixa magnitude (microscópio Leica DM 2500 acoplado a uma

câmera DFC 300 FX, Wetzlar, RDA).

3.4.13. Descarte das carcaças

As carcaças dos ratos foram armazenadas em freezers específicos do PPGCF e recolhidas pelo serviço sanitário de uma empresa especializada.

3.4.14. Protocolos Experimentais

Foram realizados 8 grupos experimentais (Tabela 2), nos quais a cirurgia foi designada como Dia 1 (D1):

Grupo Controle (CTR, n=29): Este grupo foi constituído pelos ratos que não exibiram nenhuma resposta de defesa durante a sessão de determinação do limiar de fuga na CE (D28). Uma semana após (D35), os ratos eram conectados ao cabo de estimulação, re-expostos à CE por 10 min e estimulados ficticiamente por 30 s. O pareamento do contexto e estimulação fictícia foi repetido nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Grupo Pré-estimulado (EIC-1, n=15): *Aquisição da resposta condicionada ao contexto da determinação do limiar de fuga à estimulação intracraniana.* Uma semana após a sessão de determinação do limiar de fuga, os ratos eram conectados ao cabo de estimulação, re-expostos à CE por 10 min e submetidos à estimulação da MCPD com a intensidade limiar de fuga. O pareamento do contexto com a estimulação aversiva da MCPD foi repetido nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Grupo Virgem (EIC-2, n=10): Aquisição da resposta condicionada ao contexto da estimulação intracraniana sem pré-determinação do limiar. Ao contrário do grupo EIC-1, o limiar de fuga dos ratos deste grupo foi determinado logo após a primeira exposição à CE (D35). Nos dias seguintes, o procedimento foi idêntico àquele do Grupo EIC-1.

Grupo Choque (CHQ, n=10): Aquisição de resposta condicionada ao contexto da aplicação do choque subcutâneo. Uma semana após a determinação do limiar de contorção, os ratos eram conectados ao cabo elétrico, re-expostos à CE por 10 min e submetidos a um choque subcutâneo de 30 s com a voltagem limiar de contorção. O pareamento do contexto com o choque foi repetido nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Grupo Estressado (RTR-0, n=10): Efeitos imediatos do estresse de restrição sobre a aquisição/expressão da resposta condicionada ao contexto da estimulação intracraniana. Os ratos eram submetidos ao estresse de restrição (10 min), conectados ao cabo de estimulação, re-expostos à CE por 10 min e, por fim, estimulados com o limiar de fuga. Estes procedimentos foram repetidos nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Grupo Pré-Estressado (RTR-90, n=15): Efeitos tardios do estresse de restrição sobre a aquisição/expressão da resposta condicionada ao contexto. Em D35, os ratos eram submetidos ao estresse de restrição (10 min) e devolvidos às suas gaiolas, onde permaneciam por 90 min. Após isto, eles eram conectados ao

cabo de estimulação, re-expostos à caixa de estimulação por 10 min e estimulados por 30 s com a intensidade limiar de fuga. Estes procedimentos foram repetidos nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Grupo Efeito Imediato da Corticosterona (CORT-0, n=10).

Avaliação dos efeitos imediatos (de membrana) da administração de CORT sobre a aquisição/expressão da resposta condicionada ao contexto. Em D35, os ratos eram administrados com 10 mg/kg de CORT (I.P.), conectados ao cabo de estimulação, re-expostos à caixa de estimulação (10 min) e estimulados por 30 s com a intensidade limiar de fuga. Estes procedimentos eram repetidos nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Grupo Efeito Tardio da Corticosterona (CORT-90, n=10):

Avaliação dos efeitos tardios (genômicos) da administração de CORT sobre a aquisição/expressão da resposta condicionada ao contexto. Em D35, os ratos eram administrados com 10 mg/kg de CORT (I.P.) e devolvidos às suas gaiolas, onde permaneciam por 90 min. Em seguida, eles eram conectados ao cabo de estimulação, reexpostos por 10 min à CE e estimulados por 30 s com a intensidade limiar de fuga. Estes procedimentos eram repetidos nos 4 dias subsequentes (D36-D39).

Tabela 2. Protocolos experimentais. Os limiares de galope e contorção foram determinados 28 dias após (D28) a implantação dos eletrodos para aplicação dos estímulos intracranianos (EIC) e choques subcutâneos (CHQ). A única exceção foi grupo EIC-2, cujos limiares foram determinados em D35, após a 1ª exposição dos ratos à caixa de estimulação (CE). Foram realizados 4 pareamentos adicionais em dias consecutivos (D36-D39). A contribuição do eixo HHA foi avaliada em grupos pré-estressados (10 min de restrição) quanto pré-tratados com corticosterona (10 mg/kg, I.P.). Estes procedimentos foram realizados tanto 90 min antes (RTR-90, CORT-90) quanto imediatamente antes (RTR-0, CORT-0) das exposições à CE.

Grupos	Determinação dos Limiares		Protocolos Experimentais D36-D39
	Dia 28 Uma semana antes da 1ª re-exposição à CE	Dia 35 Imediatamente após a 1ª exposição à CE	
CTR	X		CE→EIC fictícia
EIC-1	X		CE→EIC
EIC-2		X	CE→EIC
CHQ	X		CE→CHOQUE
RTR-0	X		RTR→CE→EIC
RTR-90	X		RTR→90 min→CE→EIC
CORT-0	X		CORT→CE→EIC
CORT-90	X		CORT→90 min→CE→EIC

3.4.15 Análise Estatística

Os comportamentos foram avaliados por ANOVA para medidas repetidas ($P < 0,05$). Comportamentos estatisticamente diferentes (*between-subject effects*) foram comparados aos grupos CTR e CHQ por testes *post hoc* de Dunnett. O efeito do número de pareamentos (*within-subject effects*) foi avaliado por ANOVAs separadas dos grupos com estimulação (EIC-1, EIC-2), com estimulação e restrição (RTR-0, RTR-90) ou com estimulação e CORT

(CORT-0, CORT-90) versus CHQ e CTR. Os efeitos discretos dos pareamentos foram avaliados por contrastes lineares (1 g.l.) entre a primeira exposição (D35) e cada exposição subsequente (D36-D39) (por ex., D35_{CHQ-CTR} versus D37_{CHQ-CTR}, etc). As comparações no mesmo dia (*within-day comparisons*) foram feitas por testes-t de Bonferroni ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

O limiar médio de contorção foi de $8,4 \pm 1,0$ V (30 s, 60 Hz, a.c.). Ratos submetidos à determinação do limiar de contorção (D28) apresentaram respostas conspícuas de congelamento em todas as re-exposições ao contexto da aplicação do choque (D35-D39). As respostas de congelamento iniciavam-se imediatamente após a introdução do rato na CE e caracterizavam-se por imobilidade tensa, exoftalmia e virtual supressão dos comportamentos autodirigidos (autolimpeza) e exploratórios (avaliação de risco). Em contraste, grupos que apresentaram respostas de fuga à estimulação da MCPD (D28) apresentaram atividade exploratória igual ou significativamente maior que os controles na 1ª re-exposição à CE (D35). Como não houve diferença significativa nos limiares de fuga (Tabela 3), as diferenças comportamentais devem ser atribuídas às diferenças dos protocolos destes grupos.

Tabela 3. Intensidades médias (\pm EPM) da estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (30 s, 60 Hz, a.c.).

Grupo	<i>n</i>	Limiar de Fuga (μ A)
EIC-1	15	44,7 \pm 3,0
EIC-2	10	42,0 \pm 3,4
RTR-0	15	45,0 \pm 2,1
RTR-90	15	43,3 \pm 3,1
CORT-0	10	43,0 \pm 3,3
CORT-90	10	48,5 \pm 3,6

4.1 *Comportamento dos ratos na primeira exposição/re-exposição ao contexto no qual foi realizada a determinação dos limiares de fuga ou contorção.*

A ANOVA da primeira exposição/re-exposição à CE (D35) mostrou diferenças altamente significantes para imobilidade ($F_{7,106} = 6,7$; $P < 0,0001$), locomoção ($F_{7,106} = 5,98$; $P < 0,0001$), levantar ($F_{7,106} = 3,63$; $P < 0,001$), autolimpeza ($F_{7,106} = 6,33$; $P < 0,0001$) e, em menor grau, avaliação de risco ($F_{7,106} = 2,41$; $P < 0,05$) (Fig.4). Em contraste, não foram observadas diferenças significantes para a resposta de defecação.

Em particular, o grupo CHQ apresentou períodos de imobilidade significativamente maiores que todos os outros grupos, exceto CTR e CORT-0 (Dunnett). Por sua vez, o grupo CTR apresentou períodos de imobilidade maiores que EIC-1 e RTR-0 (Fig.4). Em contraste, não foram observadas diferenças entre CTR e EIC-2. Estes dados sugerem que a pré-estimulação da MCPD com a intensidade limiar de fuga (D28) reduziu a imobilidade dos grupos EST-1 e RTR-0 na primeira re-exposição ao contexto da estimulação (D35). Como corolário, as respostas de locomoção e levantar dos grupos EIC-1 e RTR-0 foram significativamente maiores que aquelas dos grupos CHQ e CTR (Fig.4). O grupo CORT-90 também apresentou locomoção mais intensa que o grupo CHQ. Em contraste, não houve diferenças significantes nem na locomoção, nem no levantar dos outros grupos relativamente aos grupos CTR e CHQ. Por fim, enquanto a autolimpeza foi aumentada nos grupos EIC-1 (versus CHQ) e RTR-0 (versus CTR e CHQ), a avaliação de risco foi reduzida no grupo CHQ (versus CTR e RTR-0).

4.2 *Comportamento total dos ratos em 5 pareamentos do mesmo contexto a estimulações da MCPD ou choques subcutâneos.*

A ANOVA das 5 exposições ao contexto forneceu resultados similares àqueles da primeira exposição. Os grupos apresentaram diferenças significantes de imobilidade ($F_{7,106} = 6,22$; $P < 0,0001$), locomoção ($F_{7,106} = 4,71$; $P < 0,0001$), levantar ($F_{7,106} = 3,82$; $P < 0,001$), autolimpeza ($F_{7,106} = 8,69$; $P < 0,0001$) e avaliação de risco ($F_{7,106} = 2,54$; $P < 0,05$). Contudo, os grupos também diferiram quanto à resposta total de defecação ($F_{7,106} = 3,37$; $P < 0,005$) (Fig.5). Em particular, o grupo CHQ apresentou períodos de imobilidade significativamente maiores que EIC-1, EIC-2, RTR-0, CORT- 0 e CORT-90. Embora o grupo CHQ também tenha apresentado imobilidade mais intensa que CTR e RTR-90, as diferenças não atingiram o nível de significância (Dunnett). Contrariamente, o grupo CHQ apresentou respostas menores de locomoção (versus EIC-1, RTR-0, CORT-0, CORT-90), levantar (versus EIC-1, EIC- 2, RTR-0, CORT-0, CORT-90), autolimpeza (versus CTR, EIC-1 e RTR-0) e avaliação de risco (versus CTR). O grupo RTR-0 também apresentou respostas menores de imobilidade e respostas maiores de locomoção, levantar e autolimpeza relativamente aos grupos CHQ e CTR. A resposta total de defecação dos grupos CHQ e CTR também foi menor que aquela do grupo EIC-2 (Fig.5). Mais notavelmente, a autolimpeza e a avaliação de risco foram as únicas respostas do grupo CHQ estatisticamente menores que as respostas do grupo CTR (Fig.5). Portanto, as reduções na autolimpeza e avaliação de risco podem diferenciar o congelamento da mera imobilidade.

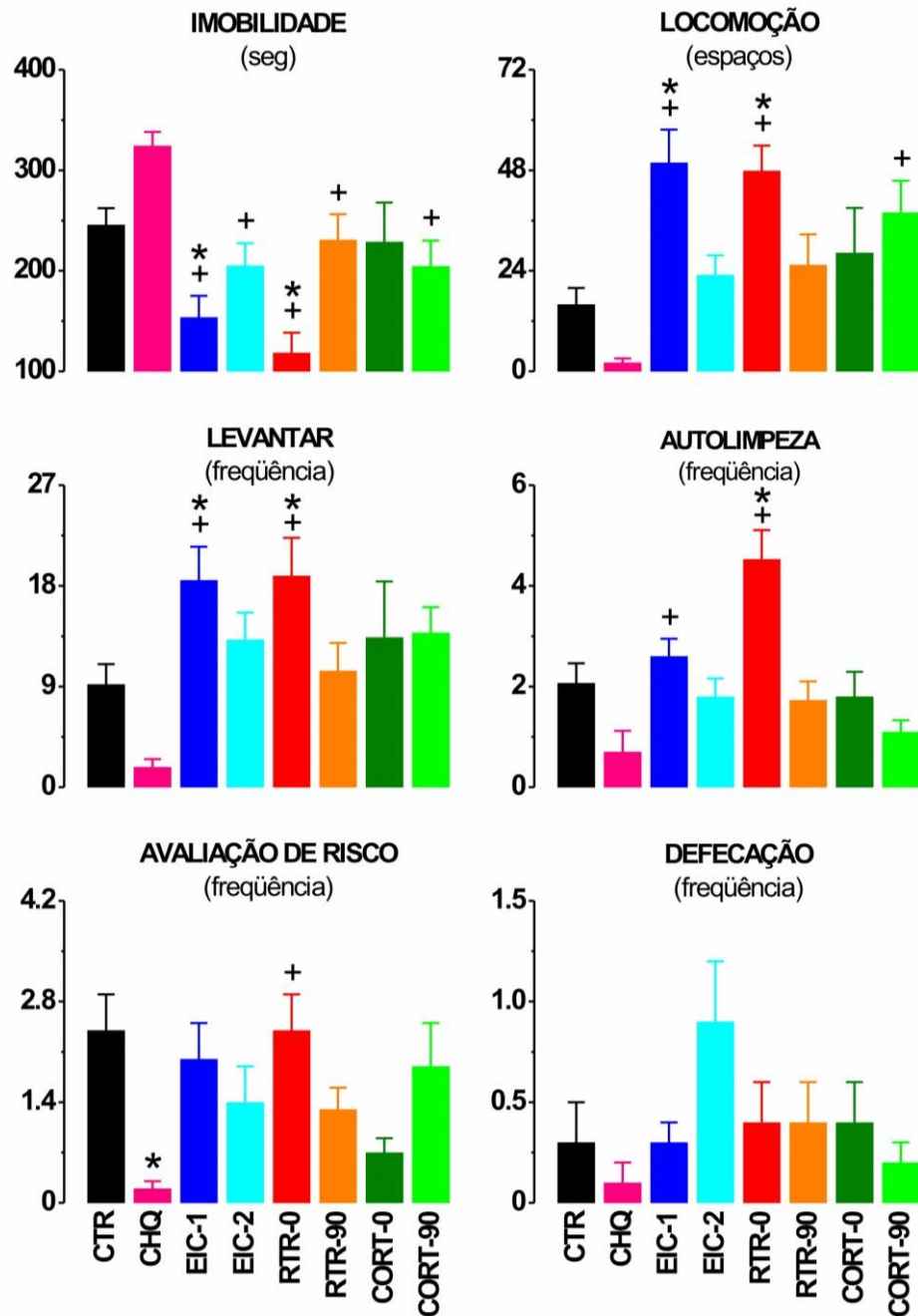


Figura 4. Respostas comportamentais na primeira exposição de ratos virgens (EIC-2) ou de ratos experientes (demais grupos) que já haviam sido submetidos a pelo menos um pareamento contexto-estímulo/choque durante a determinação dos limiares 7 dias antes. As colunas representam médias (\pm EPM). A primeira re-exposição à CE foi realizada tanto isoladamente (CTR, EIC-1, CHQ) quanto imediatamente após o estresse de restrição ou o tratamento com corticosterona (RTR-0, CORT-0), ou 90 min após estes procedimentos (RTR-90, CORT-90). * $P < 0,05$, + $P < 0,05$, diferenças significantes em relação aos grupos controle ou choque, respectivamente (teste *post hoc* de Dunnett).

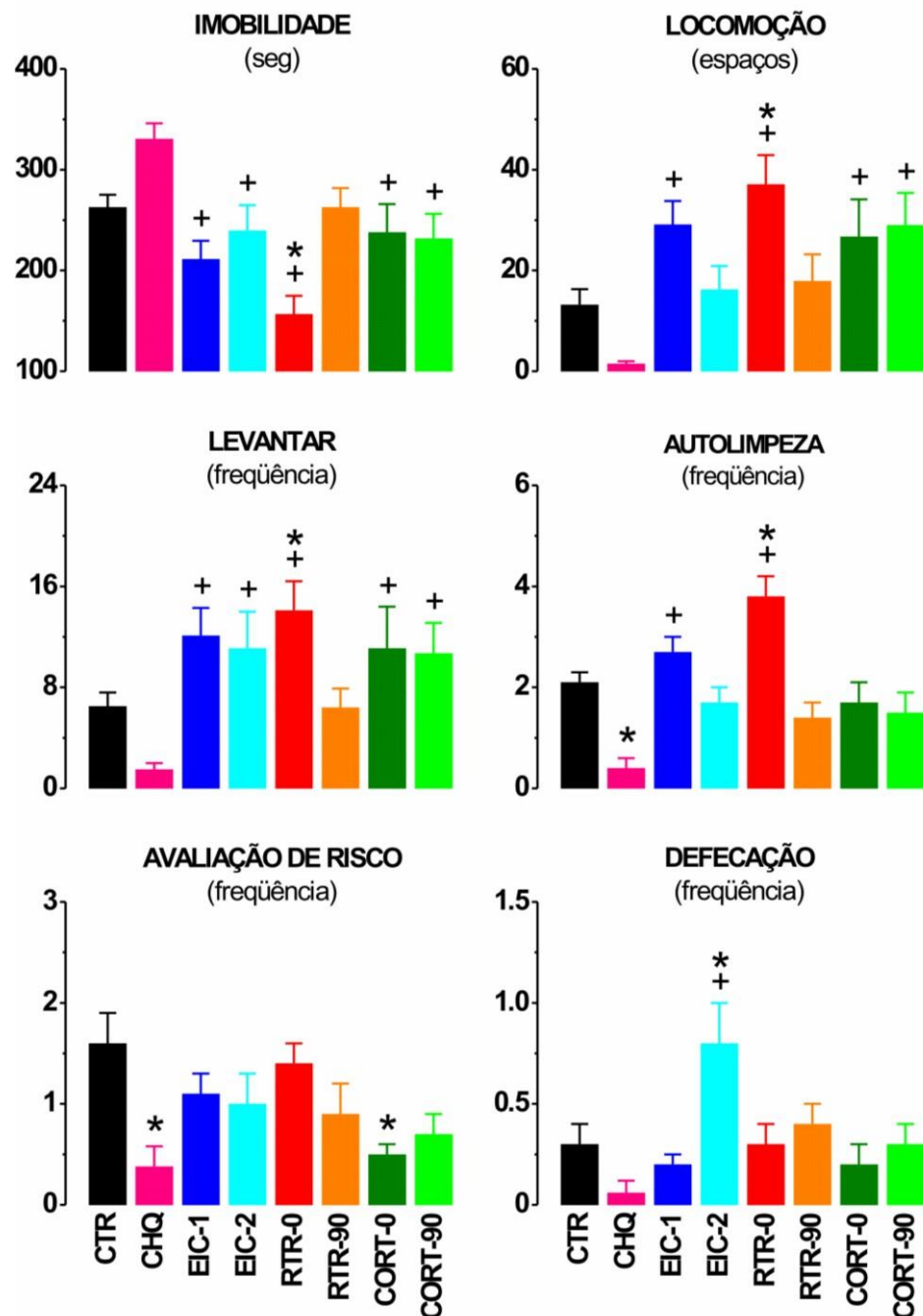


Figura 5. Respostas comportamentais totais de 5 pareamentos, em dias consecutivos, do contexto a um choque subcutâneo ou a uma estimulação da MCPD. As colunas representam médias (\pm EPM). Demais abreviaturas como na Figura 4. * * P<0,05, diferenças significantes em relação aos grupos controle ou choque, respectivamente (teste post hoc de Dunnett).

4.3 Curso temporal dos comportamentos do rato ao longo de 5 pareamentos do mesmo contexto às estimulações da MCPD ou choques subcutâneos.

Somente foram observadas diferenças significantes no curso temporal dos comportamentos de EST-1 relativamente a CHQ e CTR. Embora os

períodos de imobilidade dos ratos EST-1 foram significativamente aumentados ao longo dos pareamentos ($F_{4,56}=3,09$; $P<0,05$), não houve diferenças significativas em relação aos grupos CHQ e CTR (Fig.6). Em contraste, a resposta de locomoção do grupo EST-1 apresentou curso estatisticamente diferente da locomoção dos grupos CHQ ($F_{4,240}=2,79$, $P<0,05$) e CTR ($F_{4,240}=3,92$, $P<0,005$) (Fig.6). O curso da resposta de levantar de EST-1 também foi diferente do grupo CHQ ($F_{4,240}=2,67$, $P<0,05$) (Fig.7).

Embora a locomoção e o levantar tenham sido virtualmente idênticos na primeira exposição dos grupos EST-1 e RTR-0, a hiperatividade (locomoção, levantar e autolimpeza) somente foi mantida nas re-exposições seguintes do grupo RTR-0, sofrendo um declínio acentuado no grupo EST-1. Como a autolimpeza também foi significativamente aumentada em RTR-0, a hiperatividade não foi exclusivamente relacionada à exploração do ambiente. Em todo caso, estes dados sugerem que enquanto a hiperatividade dos ratos EST-1 e RTR-0 foi devida à pré- estimulação da MCPD durante a determinação do limiar de fuga, a manutenção da hiperatividade em RTR-0 foi devida ao estresse de restrição contíguo à re-exposição ao contexto da estimulação.

Os grupos CORT também apresentaram respostas de locomoção e levantar maiores que aquelas do grupo CHQ (Fig.6). Surpreendentemente, no entanto, o grupo RTR-90 não apresentou diferença alguma ou diferiu apenas pontualmente, em relação aos grupos CTR e CHQ. Exceto pela defecação nitidamente aumentada de EST-2, a defecação e avaliação de risco apresentaram curso complexo (Fig.8).

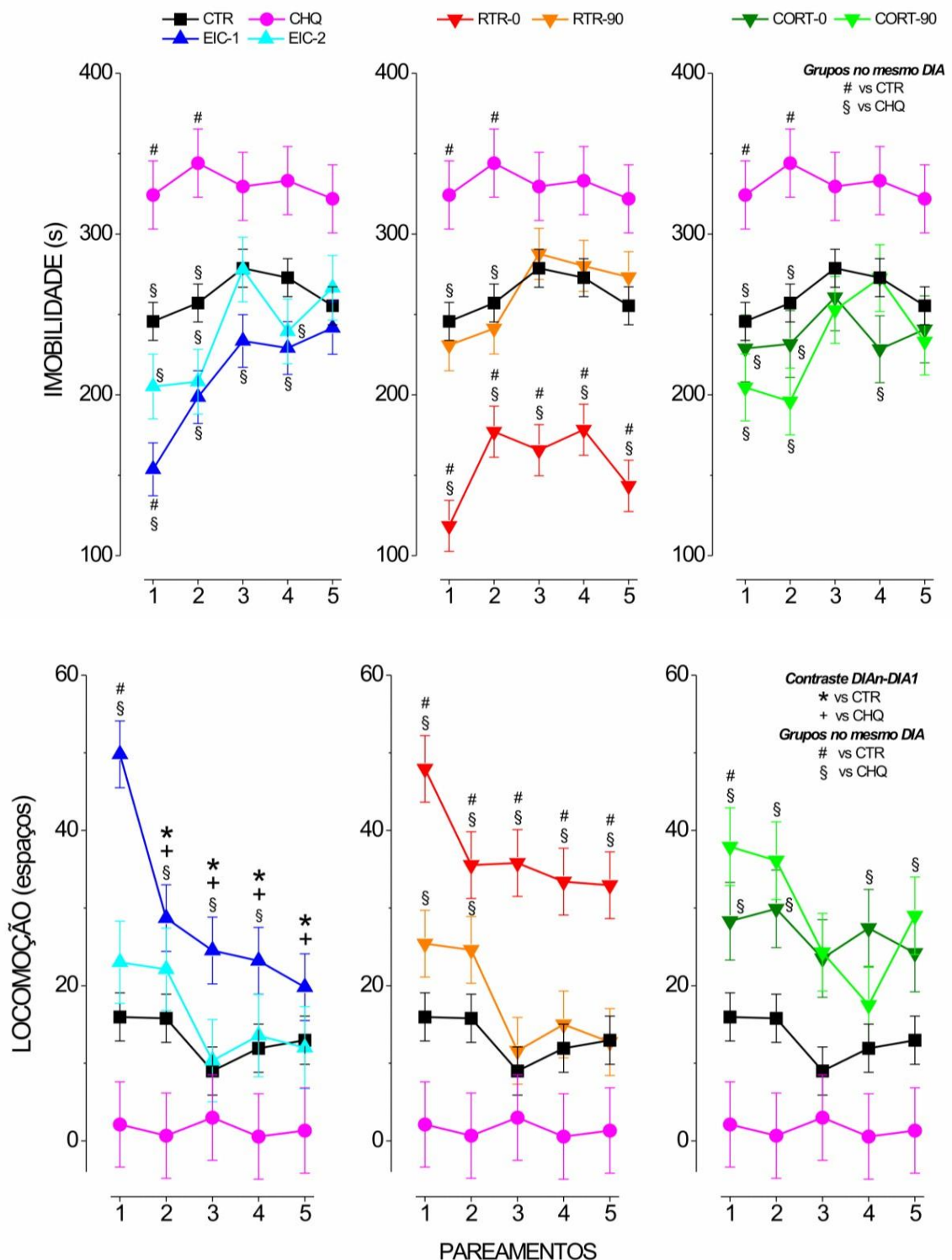


Figura 6. Respostas de imobilidade (acima) e locomoção (abaixo) ao longo de 5 pareamentos diários do mesmo contexto a choques subcutâneos ou estimulações elétricas aversivas da MCPD. O grupo CTR foi estimulado ficticiamente. Exceto por EIC-2, todos os grupos já haviam sido submetidos a um pareamento durante a determinação dos limiares 7 dias antes. * P<0,05, * P<0,05, diferente da exposição 1 em relação aos grupos CHQ ou CTR, respectivamente (contrastes lineares); \$ P<0,05, P<0,05, diferente dos grupos CHQ ou CTR, respectivamente, no mesmo dia de exposição (teste *post hoc* de Bonferroni). As barras representam o erro do tempo (*within-subject error*).

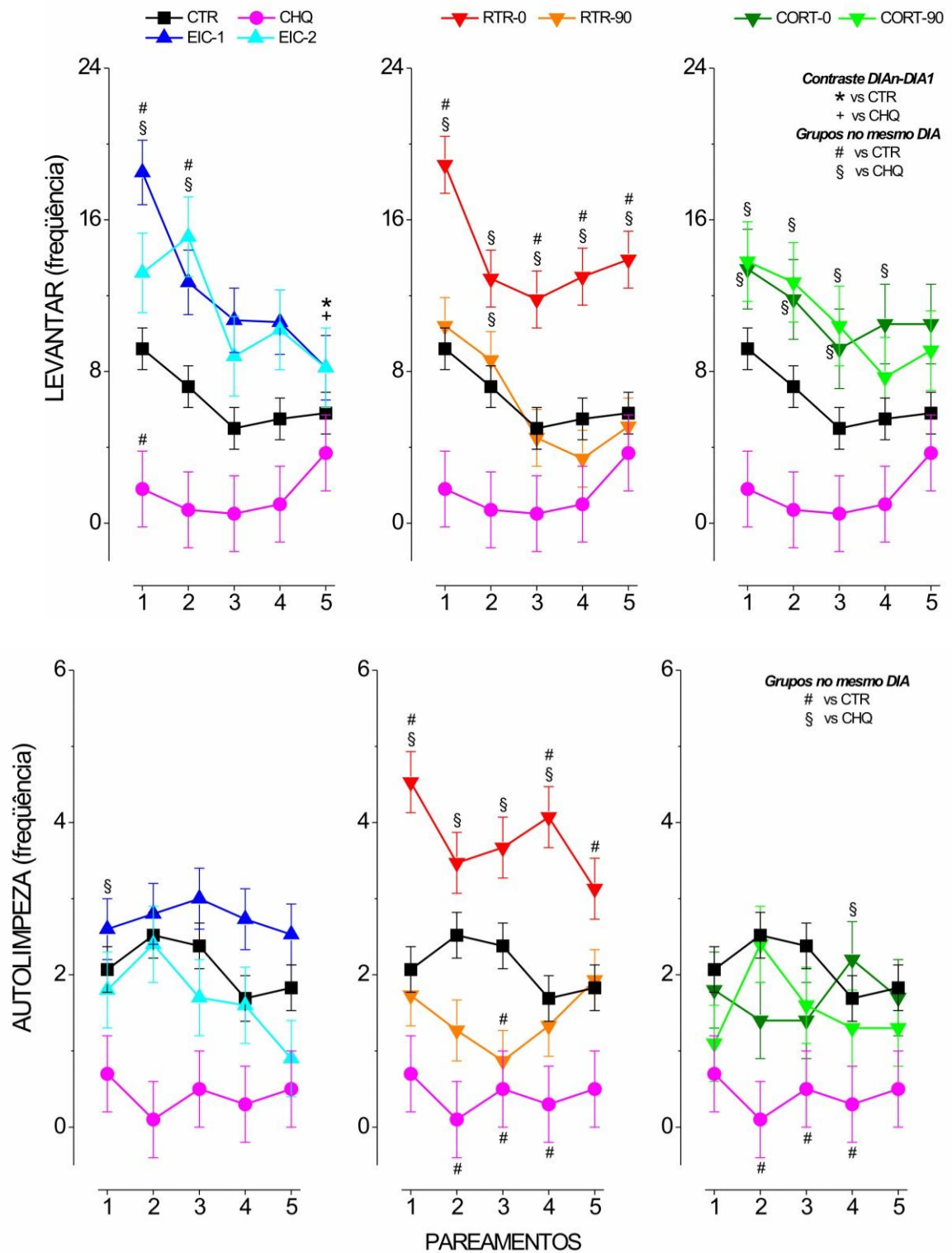


Figura 7. Respostas de levantar (acima) e autolimpeza (abaixo) ao longo de 5 pareamentos diários do mesmo contexto a choques subcutâneos ou estimulações elétricas aversivas da MCPD. Demais detalhes como na Figura 6.

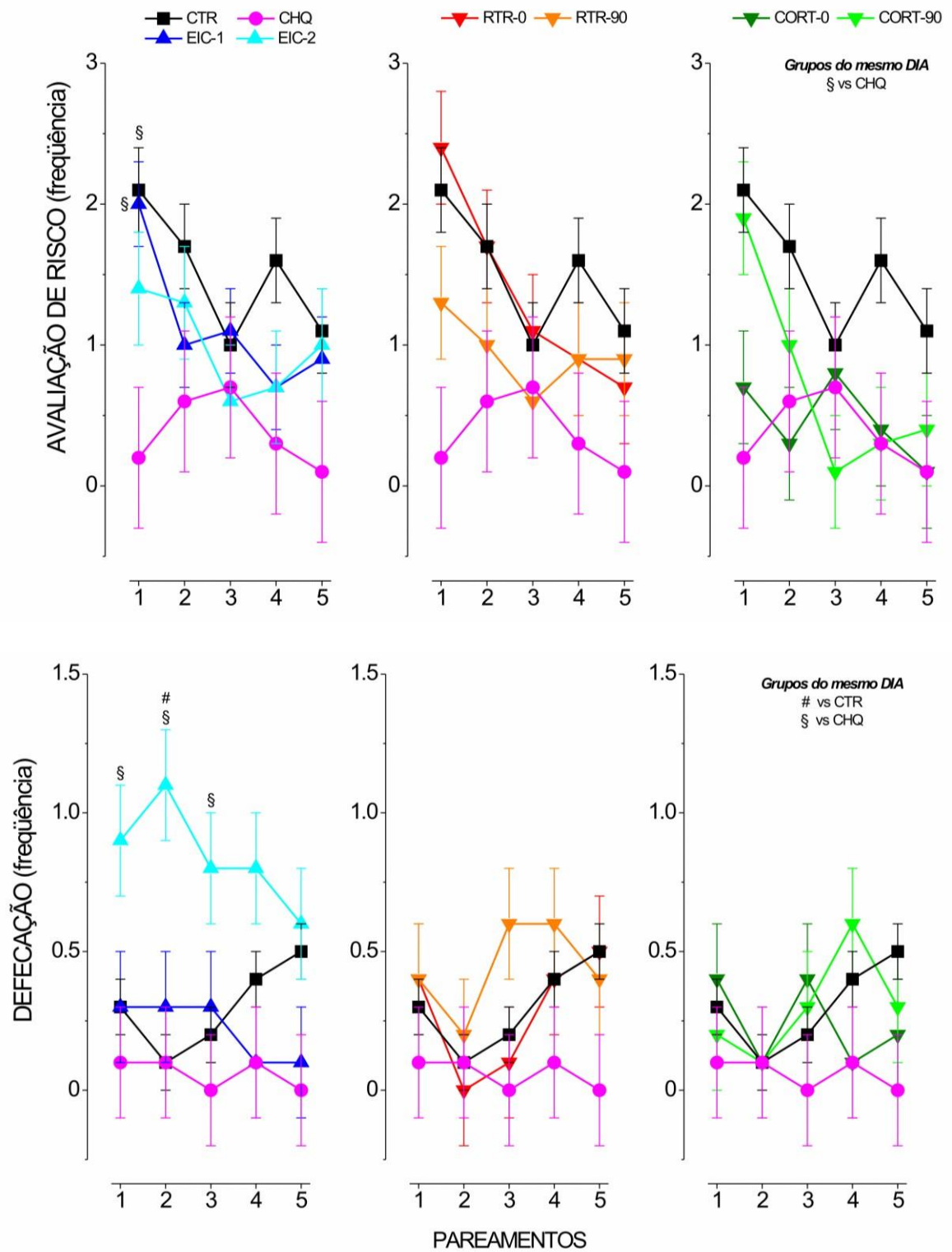


Figura 8. Respostas de avaliação de risco (acima) e defecação (abaixo) ao longo de 5 pareamentos diários do mesmo contexto a choques subcutâneos ou estimulações elétricas aversivas da MCPD. Demais detalhes como na Figura 6.

4.4. Localização dos sítios estimulados

Os sítios cuja estimulação produziu respostas de fuga com intensidades inferiores a 70 μ A localizaram-se na MCPAdI ($n=52$). Os eletrodos do grupo CTR localizaram-se nas camadas intermediárias do colículo superior e no núcleo intercolicular ($n=16$) (Fig.9).

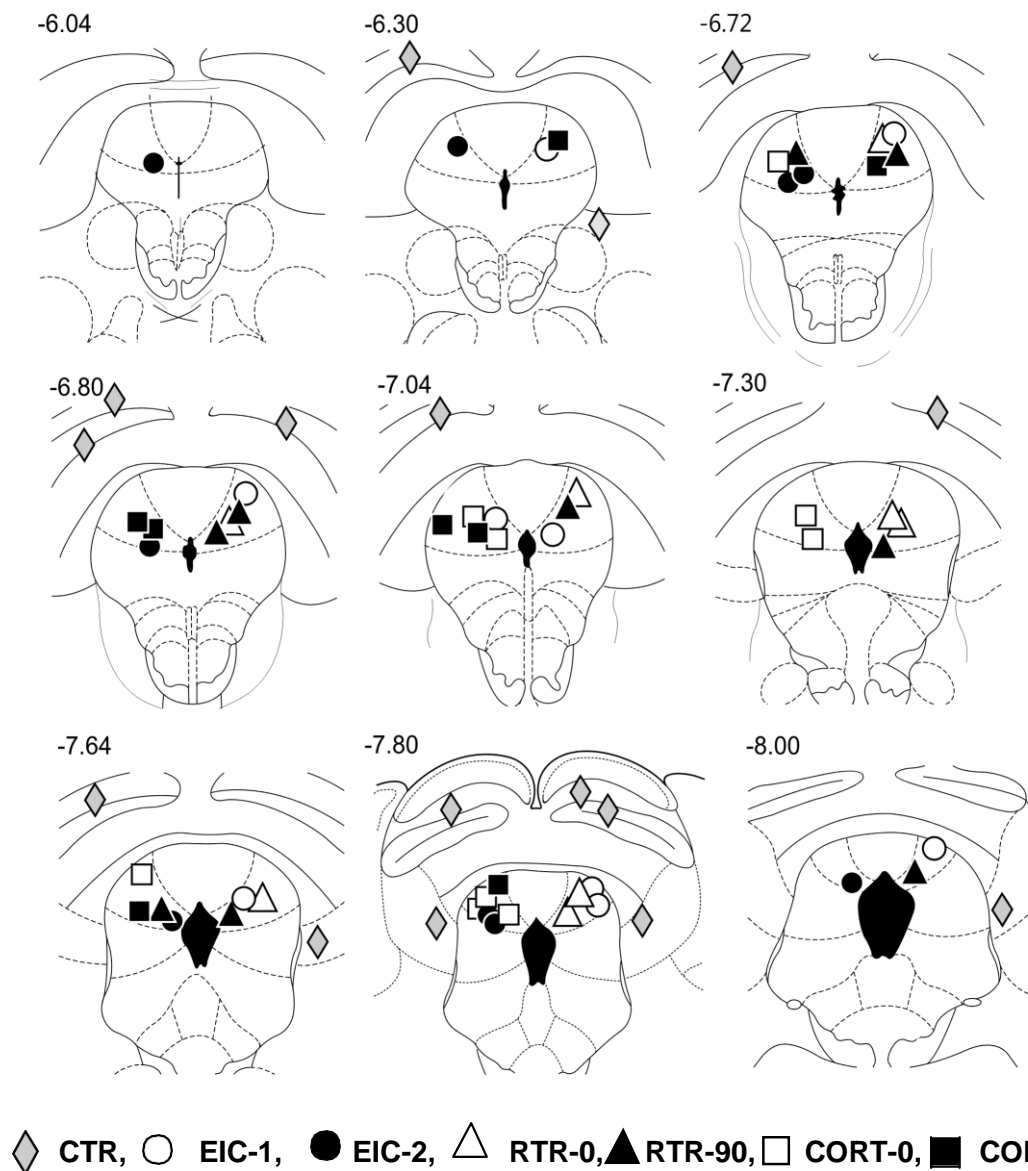


Figura 9. Sítios estimulados. Embora todos os eletrodos tenham sido implantados no lado direito do cérebro, eles foram representados em lados distintos para melhor visualização. Os números representam as coordenadas ântero-posteriores em relação ao bregma de cortes coronais do atlas do cérebro do rato de Paxinos e Watson (1998).

5 DISCUSSÃO

5.1 Ao invés do congelamento, ratos expostos ao contexto da estimulação elétrica da MCPD apresentam hiperatividade.

Respostas conspícuas de congelamento, incluindo imobilidade tensa, exoftalmia e redução da avaliação de risco (Blanchard *et al.*, 1991), somente foram observadas nos ratos expostos ao contexto do choque subcutâneo. Estes resultados mostram que os choques suportam o condicionamento contextual mesmo quando sua aplicação é independente de objetos externos, tais como grades ou bastões eletrificados. Desta forma, a aplicação de choques subcutâneos é similar à estimulação intracraniana, possibilitando comparações mais consistentes.

O grupo CHQ também apresentou períodos mais prolongados de imobilidade (89% a 96% do tempo de exposição) tanto na primeira re-exposição (D35) ao contexto em que foi determinado o limiar de contorção quanto nas 4 re-exposições (D36-D39) subsequentes. Comparados ao grupo CTR, os ratos do grupo CHQ apresentaram reduções significantes da avaliação de risco e reduções sensíveis, porém não significantes, da locomoção, levantar e autolimpeza. Portanto, a redução na avaliação de risco parece ser um elemento diferenciador entre imobilidade e congelamento. Estes resultados são consoantes com observações de retenção do medo contextual por, pelo menos, 28 dias após um único pareamento do contexto a um choque nas patas (Tulogdi *et al.*, 2012).

Em contraste, os ratos que exibiram respostas de fuga durante a sessão de determinação dos limiares (EIC-1, RTR-0) apresentaram atividade igual ou

significativamente maior (hiperatividade) que aquela de ratos virgens (EIC-2) e controles (CTR) na primeira exposição ou re-exposição ao contexto da estimulação, respectivamente. Embora a atividade do grupo EIC-1 tenha declinado significativamente ao longo das re-exposições, é importante salientar que ela jamais foi inferior à atividade dos grupos CTR, EIC-2 e, principalmente, CHQ.

Estes resultados são diametralmente opostos aos relatos de eliciação de respostas de congelamento pela exposição ao contexto da estimulação da MCPD (Kim *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2016; Zanoveli *et al.*, 2007). Embora estas diferenças possam ser devidas à ausência de estímulos salientes tanto condicionados (CS) quanto discriminativos (S^D) no presente estudo, a interpretação do estudo de Kim e colaboradores (2013) é seriamente comprometida duração marcadamente diferente do CS (som) nas sessões treino (10 estímulos de 20 s) e teste (1 estímulo de 480 s), pelo registro automatizado do congelamento como a mera ausência de movimento e, principalmente, pela ausência de um grupo controle que somente foi exposto ao som ou ao contexto. Em particular, os ratos controles (CTR) e virgens (EIC-2) do presente estudo ficaram imóveis por mais tempo (57%-77%) que os ratos de Kim e colaboradores (2013) que expostos ao som (26%) ou ao contexto (34%) associados à estimulação da MCPD.

Conforme esperado, a atividade dos ratos virgens (EIC-2) na primeira exposição ao contexto foi similar àquela dos ratos controles (CTRL) na primeira re-exposição ao contexto, 7 dias após a estimulação fictícia da MCPD. Surpreendentemente, no entanto, os ratos EIC-2 também apresentaram atividade normal em todas as exposições subsequentes à estimulação da

MCPD (D36-D39). Dentre outras possibilidades, a hiperatividade pode ter sido bloqueada pelo desenvolvimento de algum grau de inibição comportamental nas re-exposições realizadas em intervalos menores que 24 h. De fato, existem relatos de respostas de congelamento a contextos tanto discriminados quanto não-discriminados que foram associados a estimulações optogenética (Deng *et al.*, 2016) e química (Zanoveli *et al.*, 2007) da MCPD, respectivamente. A “competição” entre respostas passivas e ativas de medo não é inédita. Em particular, McNish e colaboradores (1997, 2000) mostraram que enquanto as lesões do hipocampo atenuam o medo a um contexto aversivo, elas facilitam a potenciação do susto pelo medo. Estes autores concluíram que o aparente déficit de aprendizagem do medo contextual nos ratos com lesão do hipocampo seria devido a uma “competição” entre o congelamento ao contexto aversivo e a hiperatividade decorrente da lesão do hipocampo. Ao invés da “competição” entre respostas independentes, Deakin e Graeff (1991) propuseram, que os sistemas de ansiedade (respostas passivas) e pânico (respostas ativas) inibem-se reciprocamente. Notavelmente, Tannure e colaboradores (2009) mostraram que o “abrasamento” (*kindling*) da amígdala facilita a fuga ao experimentador (resistência à captura) enquanto inibe a fuga à estimulação da MCPD, fornecendo, portanto, a primeira evidência pré-clínica da inibição recíproca dos sistemas de ansiedade e pânico da amígdala e MCPD, respectivamente. A inibição do pânico pela ansiedade explicaria tanto a indução de pânico por técnicas de meditação e relaxamento (Adler, 1987) quanto a ineficácia destas técnicas na terapia do pânico (Craske *et al.*, 1991). Pacientes de pânico sem agorafobia também parecem ser mais ativos que ambos os indivíduos saudáveis e os pacientes de pânico com agorafobia (Clark *et*

al., 1990). As últimas observações reforçam a ideia de que os pacientes de pânico mantêm-se em atividade para reduzir o risco de um AP (Deakin e Graeff, 1991). No conjunto, estes dados sugerem que a resposta pró- pânico de hiperatividade ao contexto da estimulação da MCPD possa ser bloqueada por respostas residuais de congelamento (inibição comportamental) ao mesmo contexto quando a MCPD é estimulada em intervalos menores que 24 h.

O rápido declínio da hiperatividade dos ratos EIC-1 também pode ser explicado pelo desenvolvimento progressivo de inibição comportamental ao longo dos pareamentos diários. Se este for o caso, a hiperatividade (pânico situacional) somente se expressaria se houver um intervalo longo entre as sessões treino e teste, possibilitando a dissipação da resposta de congelamento (medo condicionado). O intervalo do presente estudo (7 dias) foi, no entanto, muito menor que aquele (>28 dias) que seria necessário para o “esquecimento” do contexto previamente associado a um choque (Tulogdi *et al.*, 2012). Portanto, mesmo que haja algum grau de condicionamento ao contexto da estimulação da MCPD, ele parece ser muito mais fraco que aquele obtido pela aplicação de choques elétricos, externos ou subcutâneos. Embora o condicionamento fraco ao contexto da estimulação da MCPD seja consistente com a ausência de conexões diretas desta estrutura com o hipocampo (Cameron *et al.*, 1995), estudos de conectividade funcional em humanos sugerem que o hipocampo esteja “funcionalmente” conectado a todas as colunas da MCPA (Coulombe *et al.*, 2016).

5.2 Efeitos tempo-dependentes do estresse sobre a hiperatividade ao contexto da estimulação da MCPD.

Embora a hiperatividade (locomoção, levantar) tenha sido virtualmente idêntica na primeira re-exposição de ratos estressados (RTR-0) e não-estressados (EIC-1) (Fig.4), ela somente foi mantida nas exposições subsequentes dos ratos estressados (Fig.6). Notavelmente, a autolimpeza também foi significativamente aumentada em todas as exposições do grupo RTR-0 (Figs.4,7). Em contraste, não foram observadas diferenças significativas de atividade entre ratos pré-estressados (RTR-90) e controles (CTR). Estes dados sugerem que enquanto a hiperatividade ao contexto da estimulação da MCPD é facilitada por estresse contíguo à exposição, ela é inibida por estresses mais anteriores.

Os efeitos tempo-dependente do estresse podem ter sido devidos às ações da CORT em receptores de membrana ou nucleares (Tasker *et al.*, 2006; de Kloet *et al.*, 2008). Embora a administração sistêmica de CORT tenha produzido aumentos moderados na locomoção e levantar, estes aumentos foram observados durante re- exposições realizadas tanto imediatamente (CORT-0) quanto 90 min (CORT-90) após a administração da CORT. A similaridade dos efeitos dos tratamentos pode ter sido devida à dose elevada do glicocorticoide (10 mg/kg). Embora a administração pós-treino de uma dose elevada de CORT (10 mg⁻¹.kg⁻¹.dia⁻¹ por 5 dias) facilitou a resposta de congelamento a um CS sonoro (Corodimas *et al.*, 1994), Atsak e colaboradores (2012a) mostraram que a administração de doses reduzidas de CORT (0,3-3 mg/kg) 1 h antes das sessões-teste prejudicaram a expressão do congelamento a um contexto aversivo sem prejuízo do congelamento a um CS sonoro. Estes resultados sugerem um efeito

estímulo-específico do pré-tratamento com doses baixas de CORT. Esta noção é reforçada pelo bloqueio dos efeitos amnésicos da CORT após a microinjeção de antagonistas dos receptores endocanabinoides no hipocampo (Atsak *et al.*, 2012b). Exceto pela qualidade das respostas aos contextos associados ao choque (congelamento) e estimulação da MCPD (hiperatividade), os efeitos tardios (60 min após) das doses baixas de CORT do último estudo foram similares aos efeitos tardios (90 min após) do estresse no presente estudo.

6 Conclusões

Embora os sintomas do pânico espontâneo (incondicionado) sejam virtualmente idênticos àqueles do pânico situacional (condicionado) (Krystal *et al.*, 1991), as respostas condicionadas podem ser idênticas, similares ou opostas às respostas incondicionadas (por ex., resposta de salivação à comida e CS versus respostas de agitação e congelamento ao choque e CS, respectivamente). Em particular, a hiperatividade condicionada difere tanto do congelamento quanto da fuga à estimulação da MCPD. Não obstante, a hiperatividade pode ser o equivalente animal dos sintomas altamente variáveis que prenunciam os AP situacionais. Em todo caso, é necessário ressaltar que jamais observamos respostas conspícuas de fuga ou congelamento durante a exposição ao contexto da estimulação da MCPD realizada 24 h ou 7 dias antes.

Como os grupos EIC-1 e RTR-0 apresentaram hiperatividade virtualmente idêntica na primeira re-exposição ao contexto, a hiperatividade aumentada nas re-exposições subsequentes do grupo RTR-0 sugere que o estresse contíguo à re-exposição facilita a expressão e/ou a consolidação da

memória aversiva. Contrariamente, a inibição do eixo HHA durante os AP clínicos (Hollander *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1987; Liebowitz *et al.*, 1985; Sinha *et al.*, 1999) e experimentais (Schenberg *et al.*, 2008; de Souza Armini; 2015; Klein *et al.*, 2010) protegeria o indivíduo do desenvolvimento do pânico situacional e, possivelmente, agorafobia.

REFERÊNCIAS

- ADLER, C. M.; CRASKE, M. G.; BARLOW, D. H. Relaxation-induced panic (RIP): when resting isn't peaceful. **Integrative Psychiatry**, v. 2, p. 94-112, 1987.
- ADLER, C. M.; CRASKE, M. G.; KIRSHENBAUM, S.; BARLOW, D. H. 'Fear of panic': an investigation of its role in panic occurrence, phobic avoidance, and treatment outcome. **Behaviour Research and Therapy**, v. 27, n. 4, p. 391-396, 1989.
- AMANO, K.; TANIKAWA, T.; ISEKI, H.; KAWABATAKE, H.; NOTANI, M.; KAWAMURA, H.; KITAMURA, K. Single neuron analysis of the human midbrain tegmentum. **Applied Neurophysiology**, v. 41, p. 66-78, 1978.
- AMORAPANTH, P.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 74-79, 2000.
- AMORAPANTH, P.; NADER, K.; LEDOUX, J. E. Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. **Learning & Memory**, v. 6, n. 5, p. 491-499, 1999.
- ANGST, J.; WICKI, W. The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. In: MONTGOMERY, S. A. (Org.). **Psychopharmacology of Panic**. p. 7-24. New York: Oxford University Press, 1993.
- APA. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. v. 4th-R. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2000.
- APA. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. v. 5th. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.
- ATSAK, P.; HAUER, D.; CAMPOLONGO, P.; SCHELLING, G.; MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids interact with the hippocampal endocannabinoid system in impairing retrieval of contextual fear memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 109, n. 9, p. 3504-3509, 2012.
- ATSAK, P.; ROOZENDAAL, B.; CAMPOLONGO, P. Role of the endocannabinoid system in regulating glucocorticoid effects on memory for emotional experiences. **Neuroscience**, v. 204, p. 104-116, 2012.

- ATUCHA, E.; VUKOJEVIC, V.; FORNARI, R. V.; RONZONI, G.; DEMOUGIN, P.; PETER, F.; ATSAK, P.; COOLEN, M. W.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; MCGAUGH, J. L.; DE QUERVAIN, D. J.; ROOZENDAAL, B. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala maintains hippocampus-dependent accuracy of remote memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 114, n. 34, p. 9176-9181, 2017.
- BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 327-335, 2015.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Org.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. p. 175-198. New York: Plenum Press, 1991.
- BANNERMAN, D. M.; GRUBB, M.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; FELDON, J.; RAWLINS, J. N. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioral Brain Research**, v. 139, n. 1-2, p. 197- 213, 2003.
- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M.; YEE, B. K.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus - memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004.
- BLANCHARD, C.; WILLIAMS, G.; LEE, M. C.; BLANCHARD, R. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. **Physiological Psychology**, v. 9, p. 157-163, 1981
- BLANCHARD, D. C.; HYND, A. L.; MINKE, K. A.; MINEMOTO, T.; BLANCHARD, R. J. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 761-770, 2001.
- BLANCHARD, R.; BLANCHARD, C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70-82, 1989.
- BORELLI, K. G.; BRECHET-SOUZA, L.; FEDOCE, A. G.; FABRI, D. S.; RESSTEL, L. B.; BRANDAO, M. L. Conditioned fear is modulated by CRF mechanisms in the periaqueductal gray columns. **Hormones and Behavior**, v. 63, n. 5, p. 791-799, 2013.

- BORGES-AGUIAR, A. C.; SCHAUFFER, L. Z.; DE KLOET, E. R.; SCHENBERG, L. C. Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. **Behavioral Brain Research**, v. 344, p. 132-144, 2018.
- BRANNAN, S.; LIOTTI, M.; EGAN, G.; SHADE, R.; MADDEN, L.; ROBILLARD, R.; ABPLANALP, B.; STOFER, K.; DENTON, D.; FOX, P. T. Neuroimaging of cerebral activations and deactivations associated with hypercapnia and hunger for air. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 98, n. 4, p. 2029-2034, 2001.
- BRIGGS, A. C.; STRETCH, D. D.; BRANDON, S. Subtyping of panic disorder by symptom profile. **The British Journal of Psychiatry**, v. 163, p. 201- 209, 1993.
- BRINKS, V.; BERGER, S.; GASS, P.; DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S. Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. **Hormones and Behavior**, v. 56, n. 2, p. 232-238, 2009.
- BUSILLO, J. M.; CIDLOWSKI, J. A. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 24, n. 3, p. 109-119, 2013.
- CAMERON, A. A.; KHAN, I. A.; WESTLUND, K. N.; WILLIS, W. D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris- leucoagglutinin study. II. Descending projections. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 351, n. 4, p. 585-601, 1995.
- CAMERON, O. G.; LEE, M. A.; CURTIS, G. C.; MCCANN, D. S. Endocrine and physiological changes during "spontaneous" panic attacks. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, n. 5, p. 321-331, 1987.
- CANTERAS, N. S.; GRAEFF, F. G. Executive and modulatory neural circuits of defensive reactions: Implications for panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. 3, p. 352-364, 2014.
- CASANOVA, J. P.; CONTRERAS, M.; MOYA, E. A.; TORREALBA, F.; ITURRIAGA, R. Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats. **Behavioral Brain Research**, v. 253, p. 60-67, 2013.

- CASTILHO, V. M.; BRANDAO, M. L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, n. 2, p. 154-162, 2001.
- CASTILHO, V. M.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 165, n. 1, p. 77-85, 2002.
- CIOCCHI, S.; HERRY, C.; GRENIER, F.; WOLFF, S. B.; LETZKUS, J. J.; VLACHOS, I.; EHRLICH, I.; SPRENGEL, R.; DEISSEROTH, K.; STADLER, M. B.; MULLER, C.; LUTHI, A. Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 277-282, 2010.
- CLARK, D. B.; TAYLOR, C. B.; HAYWARD, C.; KING, R.; MARGRAF, J.; EHLERS, A.; ROTH, W. T.; AGRAS, W. S. Motor activity and tonic heart rate in panic disorder. **Psychiatry Research**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1990.
- CLARK, D. M. A cognitive approach to panic. **Behaviour Research and Therapy**, v. 24, n. 4, p. 461-470, 1986.
- CLARK, D. M.; SALKOVSKIS, P. M.; OST, L. G.; BREITHOLTZ, E.; KOEHLER, K. A.; WESTLING, B. E.; JEAUVONS, A.; GELDER, M. Misinterpretation of body sensations in panic disorder. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 65, n. 2, p. 203-213, 1997.
- CORODIMAS, K. P.; LEDOUX, J. E.; GOLD, P. W.; SCHULKIN, J. Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 746, p. 392-393, 1994.
- COULOMBE, M. A.; ERPELDING, N.; KUCYI, A.; DAVIS, K. D. Intrinsic functional connectivity of periaqueductal gray subregions in humans. **Human Brain Mapping**, v. 37, n. 4, p. 1514-1530, 2016.
- CRASKE, M. G.; BROWN, T.A.; BARLOW, D. H.. Behavioral treatment of panic disorder: A two-year follow-up. **Behavior Therapy**, 22, p. 289-304, 1991.
- CRASKE, M. G.; ROWE, M.; LEWIN, M.; NORIEGA-DIMITRI, R. Interoceptive exposure versus breathing retraining within cognitive-behavioural therapy for panic disorder with agoraphobia. **British Journal of Clinical Psychology**, v. 36, Pt 1, p. 85-99, 1997.

- DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; PECORARO, N. C.; WARNE, J. P.; LA FLEUR, S. E.; FOSTER, M. T. Glucocorticoids, the etiology of obesity and the metabolic syndrome. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 2, p. 199- 204, 2007.
- DARWIN, C.(1872). A Expressão das Emoções no Homem e nos Animais. São Paulo: Companhia das Letras, 2000.
- DASKALAKIS, N. P.; CLAESSENS, S. E.; LABOYRIE, J. J.; ENTHOVEN, L.; OITZL, M. S.; CHAMPAGNE, D. L.; DE KLOET, E. R. The newborn rat's stress system readily habituates to repeated and prolonged maternal separation, while continuing to respond to stressors in context dependent fashion. **Hormones and Behavior**, v. 60, n. 2, p. 165-176, 2011.
- DAVIS, M. A neural systems approach to the study of the amygdala, fear and anxiety. In: ELLIOTT, J. M.; HEAL, D. J.; MARSDEN, C. A. (Org.). **Experimental Approaches to Anxiety and Depression**. p. 45-71. Chichester: John Wiley & Sons, 1992.
- DAVIS, M.; WALKER, D. L.; MYERS, K. M. Role of the amygdala in fear extinction measured with potentiated startle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 985, p. 218-232, 2003.
- DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Molecular Psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 13-34, 2001.
- DE KLOET, E. R. From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. **Endocrinology**, v. 155, n. 8, p. 2754-2769, 2014.
- DE KLOET, E. R.; KARST, H.; JOELS, M. Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 268-272, 2008.
- DE KLOET, E. R.; MOLENDIJK, M. L. Coping with the forced swim stressor: Towards understanding an adaptive mechanism. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 6503162, 2016.
- DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E.; OITZL, M. S.; JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 269-301, 1998.
- DE OCA, B. M.; DECOLA, J. P.; MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 3426- 3432, 1998.
- DE SOUZA ARMINI, R.; BERNABE, C. S.; ROSA, C. A.; SILLER, C. A.; SCHIMITEL, F. G.; TUFIK, S.; KLEIN, D. F.; SCHENBERG, L. C. In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, p. 136-147, 2015.

- DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-315, 1991.
- DENG, H.; XIAO, X.; WANG, Z. Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 29, p. 7580-7588, 2016.
- DI SCALA, G.; MANA, M. J.; JACOBS, W. J.; PHILLIPS, A. G. Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 40, n. 1, p. 55-63, 1987.
- EHLERS, A.; BREUER, P. How good are patients with panic disorder at perceiving their heartbeats? **Biological Psychology**, v. 42, n. 1-2, p. 165-182, 1996.
- EHLERS, A.; BREUER, P. Increased cardiac awareness in panic disorder. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 101, n. 3, p. 371-382, 1992.
- EHLERS, A.; MARGRAF, J.; ROTH, W. T.; TAYLOR, C. B.; BIRBAUMER, N. Anxiety induced by false heart rate feedback in patients with panic disorder. **Behaviour Research and Therapy**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 1988.
- EHLERS, A.; MARGRAF, J.; ROTH, W. T.; TAYLOR, C. B.; MADDOCK, R. J.; SHEIKH, J.; KOPELL, M. L.; MCCLENAHAN, K. L.; GOSSARD, D.; BLOWERS, G. H. Lactate infusions and panic attacks: do patients and controls respond differently? **Psychiatry Research**, v. 17, n. 4, p. 295-308, 1986.
- EHLERS, A.; MAYOU, R. A.; SPRIGINGS, D. C.; BIRKHEAD, J. Psychological and perceptual factors associated with arrhythmias and benign palpitations. **Psychosomatic Medicine**, v. 62, n. 5, p. 693-702, 2000.
- FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Org.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. v. 1st, p. 151-173. New York: Plenum Press, 1991.
- FEINSTEIN, J. S.; BUZZA, C.; HURLEMANN, R.; FOLLMER, R. L.; DAHDALEH, N. S.; CORYELL, W. H.; WELSH, M. J.; TRANEL, D.; WEMMIE, J. A. Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. **Nature Neuroscience**, v. 16, p. 270-272, 2013.
- FERNANDEZ DE MOLINA, A.; HUNSPERGER, R. W. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. **Journal of Physiology (London)**, v. 160, p. 200-213, 1962.

- FLEET, R. P.; LAVOIE, K. L.; MARTEL, J. P.; DUPUIS, G.; MARCHAND, A.; BEITMAN, B. D. Two-year follow-up status of emergency department patients with chest pain: Was it panic disorder? **Canadian Journal of Emergency Medicine**, v. 5, n. 4, p. 247-254, 2003.
- FLEET, R. P.; MARTEL, J. P.; LAVOIE, K. L.; DUPUIS, G.; BEITMAN, B. D. Non-fearful panic disorder: a variant of panic in medical patients? **Psychosomatics**, v. 41, n. 4, p. 311-320, 2000.
- FREUD, S. On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis". In: BRILL, A. A. (Org.), **Selected Papers on Hysteria and other Psychoneuroses**, pp 133-154. New York: The Journal of Nervous and Mental Disease Publishing Company, 1909.
- GELDER, M. G.; CLARK, D. M.; SALKOVSKIS, P. Cognitive treatment for panic disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 27, Suppl 1, p. 171-8, 1993.
- GORMAN, J. M.; KENT, J. M.; SULLIVAN, G. M.; COPLAN, J. D. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. **The American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 4, p. 493-505, 2000.
- GRAEFF, F. G.; GARCIA-LEAL, C.; DEL-BEN, C. M.; GUIMARAES, F. S. Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 477-491, 2005.
- GRAEFF, F. G. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n. 16, p. 48-55, 2017.
- GRAEFF, F. G.; GUIMARAES, F. S.; DE ANDRADE, T. G.; DEAKIN, J. F. W. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 129-141, 1996.
- GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety**. v. 2nd, p. 1-424. Oxford: Oxford Medical Publications, 2000.
- GROSS, J. J. Emotion regulation in adulthood: Timing is everything. **Current Directions in Psychological Science**, v. 10, n. 6, p. 214-219, 2001.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-658, 2012.

- GUIOCHON-MANTEL, A.; DELABRE, K.; LESCOP, P.; MILGROM, E. Intracellular traffic of steroid hormone receptors. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 56, n. 1-6 Spec No, p. 3-9, 1996.
- ALES, R. E.; YUDOFKY, S. C. **The American Psychiatric Press Textbook of Neuropsychiatry**. Washington, DC: American Psychiatric Press, 1987.
- HAUBENSAK, W.; KUNWAR, P. S.; CAI, H.; CIOCCHI, S.; WALL, N. R.; PONNUSAMY, R.; BIAG, J.; DONG, H. W.; DEISSEROTH, K.; CALLAWAY, E. M.; FANSELOW, M. S.; LUTHI, A.; ANDERSON, D. J. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 270-276, 2010.
- HAUGER, R. L.; MILLAN, M. A.; LORANG, M.; HARWOOD, J. P.; AGUILERA, G. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. **Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 396-405, 1988.
- HOLLANDER, E.; LIEBOWITZ, M. R.; GORMAN, J. M.; COHEN, B.; FYER, A.; KLEIN, D. F. Cortisol and sodium lactate-induced panic. **Archives of General Psychiatry**, v. 46, n. 2, p. 135-140, 1989.
- IWATA, J.; LEDOUX, J. E.; REIS, D. J. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. **Brain Research**, v. 368, p. 161-166, 1986.
- JIMENEZ, S. A.; MAREN, S. Nuclear disconnection within the amygdala reveals a direct pathway to fear. **Learning & Memory**, v. 16, n. 12, p. 766-768, 2009.
- JOELS, M.; PU, Z.; WIEGERT, O.; OITZL, M. S.; KRUGERS, H. J. Learning under stress: how does it work? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, n. 4, p. 152-158, 2006.
- JOHANSEN, J. P.; TARPLEY, J. W.; LEDOUX, J. E.; BLAIR, H. T. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 979-986, 2010.
- JOHNSON, P. L.; FEDERICI, L. M.; SHEKHAR, A. Etiology, triggers and neurochemical circuits associated with unexpected, expected, and laboratory-induced panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. 14, p. 429-454, 2014.

- KEAY, K. A.; BANDLER, R. Periaqueductal Gray. In: PAXINOS, G. (Org.). **The Rat Nervous System**. v. 3rd, n. 10, p. 243-257. San Diego: Elsevier, 2004.
- KHEIRBEK, M. A.; DREW, L. J.; BURGHARDT, N. S.; COSTANTINI, D. O.; TANNENHOLZ, L.; AHMARI, S. E.; ZENG, H.; FENTON, A. A.; HEN, R. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 955-968, 2013.
- KIM, E. J.; HOROVITZ, O.; PELLMAN, B. A.; TAN, L. M.; LI, Q.; RICHTER-LEVIN, G.; KIM, J. J. Dorsal periaqueductal gray-amygdala pathway conveys both innate and learned fear responses in rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 110, n. 36, p. 14795-14800, 2013.
- KIM, J. J.; RISON, R. A.; FANSELOW, M. S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, n. 6, p. 1093-1098, 1993.
- KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 675-677, 1992.
- KLEIN, D. F. Delineation of twodrug-responsive anxiety syndromes. **Psychopharmacologia**, v. 5, p. 397-408, 1964.
- KLEIN, D. F. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. **Archives of General Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 306-318, 1993.
- KLEIN, S.; NICOLAS, L. B.; LOPEZ-LOPEZ, C.; JACOBSON, L. H.; MCARTHUR, S. G.; GRUNDSCHÖBER, C.; PRINSSSEN, E. P. Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 211, n. 2, p. 197-208, 2010.
- KRYSTAL, J. H.; WOODS, S. W.; HILL, C. L.; CHARNEY, D. S. Characteristics of panic attack subtypes: assessment of spontaneous panic, situational panic, sleep panic, and limited symptom attacks. KUMAR, K.; TOTH, C.; NATH, R. K. Deep brain stimulation for intractable pain: a 15-year experience. **Neurosurgery**, v. 40, n. 4, p. 736-746, 1997.
- LADD, C. O.; HUOT, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B.; MEANEY, M. J.; PLOTSKY, P. M. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 81-103, 2000. **Comprehensive Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 474-480, 1991.

- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review in Neuroscience**, v.23, p. 155-184, 2000.
- LEDOUX, J. E. Evolution of human emotion: a view through fear. **Progress in Brain Research**, v. 195, p. 431-442, 2012.
- LEDOUX, J. E.; CICCHETTI, P.; XAGORARIS, A.; ROMANSKI, L. M. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1062-1069
- LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **Journal of Neuroscience**, v. 8, p. 2517- 2529, 1988.
- LEDOUX, J. E.; IWATA, J.; PEARL, D.; REIS, D. J. Disruption of auditory but not visual learning by destruction of intrinsic neurons in the rat medial geniculate body. **Brain Research**, v. 371, n. 2, p. 395-399, 1986.
- LEDOUX, J. E.; SAKAGUCHI, A.; REIS, D. J. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **Journal of Neuroscience**, v. 4, n.
- LEDOUX, J. E.; SAKAGUCHI, A.; IWATA, J.; REIS, D. J. Interruption of projections from the medial geniculate body to an archi-neostriatal field disrupts the classical conditioning of emotional responses to acoustic stimuli. **Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 615-627, 1986. 3, p.
- LEVIN, A. P.; DORAN, A. R.; LIEBOWITZ, M. R.; FYER, A. J.; GORMAN, J. M.; KLEIN, D. F.; PAUL, S. M. Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. **Psychiatry Research**, v. 21, n. 1, p. 23-32, 1987. 683-698, 1984., 1990.
- LEVINE, S.; HUCTION, D. M.; WIENER, S. G.; ROSENFELD, P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat. **Developmental Psychobiology**, v. 24, n. 8, p. 547- 558, 1991.
- LIEBOWITZ, M. R.; GORMAN, J. M.; FYER, A. J.; LEVITT, M.; DILLON, D.; LEVY, G.; APPLEBY, I. L.; ANDERSON, S.; PALIJ, M.; DAVIES, S. O. Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. **Archives of General Psychiatry**, v. 42, n. 7, p. 709-719, 1985.

- LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-1662, 1997.
- MAREN, S.; FANSELOW, M. S. Electrolytic lesions of the fimbria/fornix, dorsal hippocampus, or entorhinal cortex produce anterograde deficits in contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 67, n. 2, p. 142-149, 1997.
- MAREN, S. Fear of the unexpected: hippocampus mediates novelty-induced return of extinguished fear in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 108:88-95, 2014.
- MAREN, S. Overtraining does not mitigate contextual fear conditioning deficits produced by neurotoxic lesions of the basolateral amygdala. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 3088-3097, 1998.
- MAREN, S.; ANAGNOSTARAS, S. G.; FANSELOW, M. S. The startled seahorse: is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 2, n. 2, p. 39-42, 1998.
- MAREN, S.; FANSELOW, M. S. The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? **Neuron**, v. 16, n. 2, p. 237-240, 1996.
- MAREN, S.; HOBIN, J. A. Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. **Learning & Memory**, v. 14, n. 4, p. 318-324, 2007.
- MARGRAF, J.; BARLOW, D. H.; CLARK, D. M.; TELCH, M. J. Psychological treatment of panic: work in progress on outcome, active ingredients, and follow-up. **Behaviour Research and Therapy**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 1993.
- MARTINEZ, R. C.; DE OLIVEIRA, A. R.; BRANDÃO, M. L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, n. 1, p. 58-65, 2006.
- McLAUGHLIN, K. A.; GREEN, J. G.; GRUBER, M. J.; SAMPSON, N. A.; ZASLAVSKY, A. M.; KESSLER, R. C. Childhood adversities and adult psychopathology in the National Comorbidity Survey Replication (NCS- R) III: associations with functional impairment related to DSM-IV disorders. **Psychological Medicine**, v. 40, n. 5, p. 847-859, 2010.

- McNISH, K. A.; GEWIRTZ, J. C.; DAVIS, M. Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear-potentiated startle. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 23, p. 9353-9360, 1997.
- MOBBS, D.; PETROVIC, P.; MARCHANT, J. L.; HASSABIS, D.; WEISKOPF, N.; SEYMOUR, B.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. When fear is near: threat imminence elicits prefrontal-periaqueductal gray shifts in humans. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1079-1083, 2007.
- MOSCARELLO, J. M.; MAREN, S. Flexibility in the face of fear: Hippocampal- prefrontal regulation of fear and avoidance. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 19, p. 44-49, 2018.
- MULLER, C. J.; QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W.; SCHIMITEL, F. G.; TUFIK, S.; BEIJAMINI, V.; CANTERAS, N. S.; SCHENBERG, L. C. On the verge of a respiratory-type panic attack: Selective activations of rostromedial and caudomedial periaqueductal gray matter following short- lasting escape to a low dose of potassium cyanide. **Neuroscience**, v. 348, p. 228-240, 2017.
- NADER, K.; MAJIDISHAD, P.; AMORAPANTH, P.; LEDOUX, J. E. Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 156-163, 2001.
- NASHOLD JR., B. S.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, v. 30, p. 14-24, 1969.
- OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R. Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 1, p. 62-71, 1992.
- PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 391-404, 2001.
- PETROWSKI, K.; HEROLD, U.; JORASCHKY, P.; WITTCHEN, H. U.; KIRSCHBAUM, C. A striking pattern of cortisol non-responsiveness to psychosocial stress in patients with panic disorder with concurrent normal cortisol awakening responses. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 414-421, 2010.

- PETROWSKI, K.; WINTERMANN, G. B.; SCHAARSCHMIDT, M.; BORNSTEIN, S. R.; KIRSCHBAUM, C. Blunted salivary and plasma cortisol response in patients with panic disorder under psychosocial stress. **International Journal of Psychophysiology**, v. 88, n. 1, p. 35-39, 2013.
- PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274-285, 1992.
- PRETER, M.; KLEIN, D. F. Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, n. 3, p. 603-612, 2008.
- PRETER, M.; KLEIN, D. F. Lifelong opioidergic vulnerability through early life separation: A recent extension of the false suffocation alarm theory of panic disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n. 14, p. 345-351, 2014.
- QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W.; MULLER, C. J.; BERNABE, C. S.; ROSA, C. A.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally- isolated adult rats. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90726, 2014.
- RADLEY, J. J.; GOSSELINK, K. L.; SAWCHENKO, P. E. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 22, p. 7330-7340, 2009.
- RADLEY, J. J.; SAWCHENKO, P. E. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 26, p. 9683-9695, 2011.
- RADLEY, J. J.; SAWCHENKO, P. E. Evidence for involvement of a limbic paraventricular hypothalamic inhibitory network in hypothalamic- pituitary-adrenal axis adaptations to repeated stress. **Journal of Comparative Neurology**, v. 523, n. 18, p. 2769-2787, 2015.
- RAFF, H.; ROARTY, T. P. Renin, ACTH, and aldosterone during acute hypercapnia and hypoxia in conscious rats. **American Journal of Physiology**, v. 254, n. 3 Pt 2, p. R431-R435, 1988.

- RAFF, H.; SANDRI, R. B.; SEGERSON, T. P. Renin, ACTH, and adrenocortical function during hypoxia and hemorrhage in conscious rats. **American Journal of Physiology**, v. 250, n. 2 Pt 2, p. R240-R244, 1986.
- REDGRAVE, P.; DEAN, P. Does the PAG learn about emergencies from the superior colliculus? In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Org.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. p. 199-209. New York: Plenum Press, 1991.
- REUL, J. M.; DE KLOET, E. R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinology**, v. 117, n. 6, p. 2505-2511, 1985.
- RIMMELE, U.; MEIER, F.; LANGE, T.; BORN, J. Suppressing the morning rise in cortisol impairs free recall. **Learning & Memory**, v. 17, n. 4, p. 186-190, 2010.
- RIZVI, T. A.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M. M.; SHIPLEY, M. T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **Journal of Comparative Neurology**, v. 303, n. 1, p. 121-131, 1991.
- ROBERSON-NAY, R.; EAVES, L. J.; HETTEMA, J. M.; KENDLER, K. S.; SILBERG, J. L. Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. **Depression and Anxiety**, v. 29, n. 4, p. 320-327, 2012.
- ROBERSON-NAY, R.; KENDLER, K. S. Panic disorder and its subtypes: a comprehensive analysis of panic symptom heterogeneity using epidemiological and treatment seeking samples. **Psychological Medicine**, v. 41, n. 11, p. 2411-2421, 2011.
- RUIZ-TORNER, A.; OLUCHA-BORDONAU, F.; VALVERDE-NAVARRO, A. A.; MARTINEZ-SORIANO, F. The chemical architecture of the rat's periaqueductal gray based on acetylcholinesterase histochemistry: a quantitative and qualitative study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 21, n. 4, p. 295-312, 2001.
- SAPOLSKY, R. M. Depression, antidepressants, and the shrinking hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 98, n. 22, p. 12320-12322, 2001.
- SCHENBERG, L. C. A neural systems approach to the study of respiratory-type panic disorder. In: NARDI, A. E.; FREIRE, R. C. (Org.). **Panic Disorder**, p. 9-77. Basel: Springer International, 2016.

- SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRÉ, E. C. M.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 647-659, 2001.
- SCHENBERG, L. C.; DOS REIS, A. M.; FERREIRA POVOA, R. M.; TUFIK, S.; SILVA, S. R. A panic attack-like unusual stress reaction. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 5, p. 584-591, 2008.
- SCHENBERG, L. C.; PÓVOA, R. M. F.; COSTA, A. L.; CALDELLAS, A. V.; TUFIK, S.; BITTENCOURT, A. S. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1279-1298, 2005.
- SCHENBERG, L. C.; SCHIMITEL, F. G.; ARMINI, R. S.; BERNABE, C. S.; ROSA, C. A.; TUFIK, S.; MULLER, C. J.; QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W. Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 46, n. 14, p. 472-496, 2014.
- SCHENBERG, L. C.; VASQUEZ, E. C.; DA COSTA, M. B. Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction in freely moving rats. **Brain Research**, v. 621, n. 1, p. 50-58, 1993.
- SCHIMITEL, F. G.; DE ALMEIDA, G. M.; PITOL, D. N.; ARMINI, R. S.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 200, n. 1, p. 59-73, 2012.
- SCHIMITEL, F. G.; MULLER, C. J.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 12, p. 1184-1188, 2014.
- SCHREIBER, W.; LAUER, C. J.; KRUMREY, K.; HOLDSBOER, F.; KRIEG, J. C. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in panic disorder. SHERMAN, J. E.; KALIN, N. H. ICV-CRH Alters stress-induced freezing behavior without affecting pain sensitivity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 30, p. 801-807, 1988.
- SINHA, S. S.; COPLAN, J. D.; PINE, D. S.; MARTINEZ, J. A.; KLEIN, D. F.; GORMAN, J. M. Panic induced by carbon dioxide inhalation and lack of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. **Psychiatry Research**, v. 86, n. 2, p. 93-98, 1999. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 7-15, 1996.

- SOUZA, R. R.; DAL, B. S.; DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; CAROBREZ, A. P. Paradoxical mineralocorticoid receptor-mediated effect in fear memory encoding and expression of rats submitted to an olfactory fear conditioning task. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 201-11, 2014.
- SPIACCI, A., Jr.; DE OLIVEIRA, S. T.; DA SILVA, G. S.; GLASS, M. L.; SCHENBERG, L. C.; GARCIA-CAIRASCO, N.; ZANGROSSI, H., Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray inhibits panic-like defensive behaviors in rats exposed to acute hypoxia. **Neuroscience**, v. 307, p. 191-198, 2015.
- SPIGA, F.; WALKER, J. J.; TERRY, J. R.; LIGHTMAN, S. L. HPA axis-rhythms. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1273-1298, 2014.
- STIRTON, R. F.; BRANDON, S. Preliminary report of a community survey of panic attacks and panic disorder. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 81, n. 7, p. 392-393, 1988.
- SUCHECKI, D.; MOZAFFARIAN, D.; GROSS, G.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. **Neuroendocrinology**, v. 57, n. 2, p. 204-212, 1993.
- SUCHECKI, D.; NELSON, D. Y.; VAN, O. H.; LEVINE, S. Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 169-182, 1995.
- SUCHECKI, D.; ROSENFELD, P.; LEVINE, S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. **Developmental Brain Research**, v. 75, n. 2, p. 185-192, 1993.
- SUDRÉ, E. C. M.; BARROS, M. R.; SUDRÉ, G. N.; SCHENBERG, L. C. Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 141- 154, 1993.
- TANNURE, R. M.; BITTENCOURT, A. S.; SCHENBERG, L. C. Short-term full kindling of the amygdala dissociates natural and periaqueductal gray- evoked flight behaviors of the rat. **Behavioral Brain Research**, v. 199, p. 247-256, 2009.
- TASKER, J. G.; DI, S.; MALCHER-LOPES, R. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5549-5556, 2006.

- TOVOTE, P.; ESPOSITO, M. S.; BOTTA, P.; CHAUDUN, F.; FADOK, J. P.; MARKOVIC, M.; WOLFF, S. B.; RAMAKRISHNAN, C.; FENNO, L.; DEISSEROTH, K.; HERRY, C.; ARBER, S.; LUTHI, A. Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 206-212, 2016.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LUTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317-331, 2015.
- TULOGDI, A.; SOROS, P.; TOTH, M.; NAGY, R.; BIRO, L.; ALICZKI, M.; KLAUSZ, B.; MIKICS, E.; HALLER, J. Temporal changes in c-Fos activation patterns induced by conditioned fear. **Brain Research Bulletin**, v. 88, n. 4, p. 359-370, 2012.
- VELDHUIS, H. D.; DE KORTE, C. C.; DE KLOET, E. R. Glucocorticoids facilitate the retention of acquired immobility during forced swimming. **European Journal of Pharmacology**, v. 115, n. 2-3, p. 211-217, 1985.
- VIANNA, D. M.; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Lesion of the ventral periaqueductal gray reduces conditioned fear but does not change freezing induced by stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Learning & Memory**, v. 8, n. 3, p. 164-169, 2001a.
- VIANNA, D. M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7- 8, p. 711-719, 2001b.
- VIANNA, D. M.; BRANDÃO, M. L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 557-566, 2003a.
- VIANNA, D. M.; BORELLI, K. G.; FERREIRA-NETTO, C.; MACEDO, C. E.; BRANDÃO, M. L. Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 3, p. 179-189, 2003b.
- WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B. S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 588, n. 2, p. 341-345, 1992.
- WIEST, G.; LEHNER-BAUMGARTNER, E.; BAUMGARTNER, C. Panic attacks in an individual with bilateral selective lesions of the amygdala. **Archives of Neurology**, v. 63, n. 12, p. 1798-1801, 2006.

- WOODS, S. W.; CHARNEY, D. S.; MCPHERSON, C. A.; GRADMAN, A. H.; HENINGER, G. R. Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. **Archives of General Psychiatry**, v. 44, n. 4, p. 365-375, 1987.
- WOODS, S. W.; CHARNEY, D. S.; GOODMAN, W. K.; HENINGER, G. R. Carbon dioxide-induced anxiety. Behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. **Archives of General Psychiatry**, v. 45, n. 1, p. 43-52, 1988.
- YOUNG, R. F. Brain and spinal stimulation: how and to whom! **Clinical Neurosurgery**, v. 35, p. 429-447, 1989.
- ZANOVELI, J. M.; FERREIRA-NETTO, C.; BRANDÃO, M. L. Conditioned place aversion organized in the dorsal periaqueductal gray recruits the laterodorsal nucleus of the thalamus and the basolateral amygdala. **Experimental Neurology**, v. 208, n. 1, p. 127-136, 2007.
- ZHOU, M.; BAKKER, E. H.; VELZING, E. H.; BERGER, S.; OITZL, M.; JOELS, M.; KRUGERS, H. J. Both mineralocorticoid and glucocorticoid receptors regulate emotional memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 530-537, 2010.
- ZIEMANN, A. E.; ALLEN, J. E.; DAHDALEH, N. S.; DREBOT, I. I.; CORYELL, M. W.; WUNSCH, A. M.; LYNCH, C. M.; FARACI, F. M.; HOWARD, M. A., III; WELSH, M. J.; WEMMIE, J. A. The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 1012-1021, 2009.